

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Adéla Pravdová

Separace a identifikace lipopeptidů pomocí chromatografie a
hmotnostní spektrometrie

Separation and identification of lipopeptides by chromatography and mass
spectrometry

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. května 2019.

.....

Adéla Pravdová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za důvěru a poskytnutí možnosti vypracovat svojí diplomovou práci na oddělení hmotnostní spektrometrie na ÚOCHB AV ČR.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martinu Hubálkovi, Ph.D. za ochotu, odbornou pomoc a vedení, bez čehož by tato diplomová práce nevznikla.

Poslední poděkování patří Ing. Michalu Koreckému za jeho trpělivost a poskytnutí pomoci při práci v laboratoři, kdykoli jsem o ni požádala.

Abstrakt

Lipidace proteinů zaujímá významné místo ve skupině posttranslačních modifikací. Zastává důležitou roli v procesech diferenciaci buněk nebo synaptických přenosů. Změny v přítomnosti lipidovaných proteinů může v některých případech poukazovat na výskyt lidských onemocnění jako např. Huntingtonova choroba, schizofrenie nebo rakovina. Z tohoto důvodu se jejich analýza stala žádanou a díky svým specifickým vlastnostem také problematickou.

Tato práce je zaměřena na vývoj podmínek měření lipopeptidů vzniklých štěpením proteinů obsahujících lipomodifikaci. Byly testovány dva postupy separace, při kterých bylo cílem nabohacení lipopeptidů a zároveň odstranění co nejvíce ostatních molekul obsažených ve vzorcích. Prvním testovaným způsobem byla separace na fázovém rozhraní, při které za použití vody a chloroformu bylo dosaženo zakoncentrování lipopeptidů na fázovém rozhraní a odseparování části přidaných nemodifikovaných peptidů ze směsi. Druhým způsobem separace byla extrakce prováděná na pevné fázi za použití C18 stacionární fáze. Jako vhodnější varianta extrakce na pevné fázi byla v porovnání s roztoky obsahujícími isopropylalkohol vybrána eluce roztoky obsahující acetonitril s přídavkem kyseliny trifluoroctové. S optimalizovaným elučním postupem bylo možné separovat nemodifikované peptidy od lipopeptidů bez velkých ztrát.

Takto optimalizované postupy byly aplikovány na vzorky získané tryptickým štěpením proteinu viru myšího tumoru prsních žláz, který obsahuje ve své struktuře lipomodifikaci. Získané vzorky byly analyzovány na LC-MS. Výsledky ukázaly, že oba postupy separace - jak separace na fázovém rozhraní tak extrakce na pevné fázi - jsou schopny i ve složitějších směsích lipopeptidy odseparovat od nemodifikovaných peptidů se ztrátou do 10 %. Zároveň jsou lipopeptidy natolik zakoncentrovány, že je možné je analyzovat a následně i identifikovat pomocí prohledávání v databázích, např. ProteinPilot (SCIEX).

Klíčová slova: lipoproteiny, lipopeptidy, separace, extrakce, SPE, LLE, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie

Abstract

Protein lipidation occupies an important place in the post-translational modification group. It plays an important role in the processes of cell differentiation or synaptic transmission. Changes in the presence of lipidated proteins may in some cases indicate the appearance of human diseases such as Huntington's disease, schizophrenia, or cancer. For this reason, their analysis has become desirable, but also problematic due to its specific characteristics.

This work is focused on the development of conditions for measurement of lipopeptides produced by cleavage of proteins containing lipomodification. Two separation procedures were tested, in which the aim of work was to enrich the lipopeptides and remove as many other molecules as possible from the samples. The first test method - phase interface separation, using water and chloroform, was able to concentrate the lipopeptides on the phase interface and separate some of the added unmodified peptides from the mixture. The second method of separation was a solid phase using a C18 stationary phase. As a more suitable solid phase extraction variant, elution with solutions containing acetonitrile with trifluoroacetic acid was chosen as compared to solutions containing isopropyl alcohol. With the modified elution procedure, it was possible to separate unmodified peptides from the lipopeptides without major losses.

Thus optimized procedures were applied to samples obtained by tryptic digests of the mouse mammary tumor virus protein, which contains lipomodification in its structure. The obtained samples were analyzed by LC-MS. The results showed that both methods - phase interface separation and solid-phase extraction - are capable to separate lipopeptides from unmodified peptides at a loss of up to 10 % in complex mixtures. At the same time, lipopeptides are concentrated and it is possible to analyze and subsequently identify them by searching in databases such as ProteinPilot (SCIEX).

Keywords: lipoproteins, lipopeptides, separation, extraction, SPE, LLE, mass spectrometry, liquid chromatography

Obsah

Abstrakt	4
Abstract.....	5
Obsah	6
Seznam zkratek.....	8
Seznam veličin a symbolů	9
1. Úvod.....	10
1.1 Cíl práce	10
2. Teoretická část.....	11
2.1 Lipoproteiny	11
2.2 Kapalinová chromatografie	13
2.2.1 Kapalinová chromatografie s reverzní fází	14
2.3 Hmotnostní spektrometrie	15
2.3.1 Iontové zdroje.....	15
2.3.1.1 Ionizace elektrosprejem	16
2.3.2 Hmotnostní analyzátory	16
2.3.2.1 Analyzátor doby letu.....	16
2.3.2.2 Kvadrupól	17
2.4 Aplikace LC-MS na proteomickou analýzu	18
2.5 Analýza lipopeptidů	19
3. Experimentální část	21
3.1 Použité chemikálie a vybavení	21
3.2 Instrumentace	21
3.3 Experimentální podmínky	22
3.4 Příprava zásobních roztoků lipopeptidů	23
3.5 Sledování rozpustnosti, stability a chování lipopeptidů v roztocích	23
3.6 Separace na fázovém rozhraní.....	24
3.7 Extrakce na pevné fázi.....	24
3.8 Enzymatické štěpení lipoproteinu pomocí trypsinu	24
4. Výsledky a diskuze.....	26
4.1 Rozpustnost, stabilita a chování lipopeptidů v roztoku.....	26
4.2 Separace na fázovém rozhraní.....	28

4.3 Extrakce na pevné fázi.....	38
5. Závěr.....	53
6. Seznam použité literatury	54

Seznam zkratek

LC (liquid chromatography) - kapalinová chromatografie

MS (mass spectrometry) - hmotnostní spektrometrie

LC-MS - kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

HPLC (high - performance liquid chromatography) - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

RP-HPLC (reversed - phase high - performance liquid chromatography) - vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází

UV (ultraviolet) - ultrafialová oblast spektra elektromagnetického záření

ESI (electrospray ionization) - ionizace elektrosprejem

MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) - laserová desorpce/ ionizace za přítomnosti matrice

TOF (time of flight) - analyzátor doby letu

Q (quadrupole) - kvadrupólový analyzátor

TOF/TOF - tandemová hmotnostní spektrometrie pomocí analyzátorů doby letu

Q - TOF - tandemová hmotnostní spektrometrie pomocí kvadrupólu a analyzátoru doby letu

IT - TOF - tandemová hmotnostní spektrometrie pomocí iontové pasti a analyzátoru doby letu

LC-MS/MS - kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

LLE (liquid - liquid extraction) - extrakce kapalina – kapalina

SPE (solid phase extraction) - extrakce na pevné fázi

MeOH - methanol

TFA - kyselina trifluoroctová

FA - kyselina mravenčí

TFE - 2,2,2 - trifluoetanol

IAA - jodoacetamid

DTT - dithiotreitol

IPA - isopropylalkohol (propan - 2 - ol)

MMTV (mouse mammary tumor virus) - vir myšího tumoru prsních žláz

Seznam veličin a symbolů

A - plocha píku

t - čas

mM - milimolární koncentrace

m/z - hmotnost/náboj

t_r - retenční čas

1. Úvod

Mezi stovkami tříd známých posttranslačních modifikací objevených v eukaryotních organizmech se lipidace proteinů řadí mezi velmi důležité. Hraje významnou roli ve fyziologických procesech a v lidských onemocněních jako např. Huntingtonova choroba, schizofrenie nebo rakovina. Dále reguluje diferenciaci buněk, synaptický přenos a v neposlední řadě interaguje s komponenty v buněčných membránách.

Analýza lipoproteinů byla dříve náročná zejména kvůli nedostatku specifických protilátek a omezeným možnostem jejich detekce. K překonání těchto obtíží byly vyvinuty metody selektivního chemického značení za účelem označování specifických forem lipoproteinů. Tento postup umožnil analýzu lipoproteinů pomocí metod kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. Selektivní chemické metody umožnily analýzu zejména N - myristoylovaných a S - palmitoylovaných lipoproteinů v různých organismech. Do dnešního dne bylo popsáno okolo 800 lipoproteinových modifikací na proteinech v lidském organismu (UniProt).

1.1 Cíl práce

Cílem diplomové práce je vyvinout separační metodu, která dokáže oddělit lipopeptidy vzniklé štěpením lipoproteinu od ostatních peptidů, kterých je ve zkoumaných vzorcích nadbytek, a zároveň umožní následnou identifikaci lipopeptidů pomocí MS/MS.

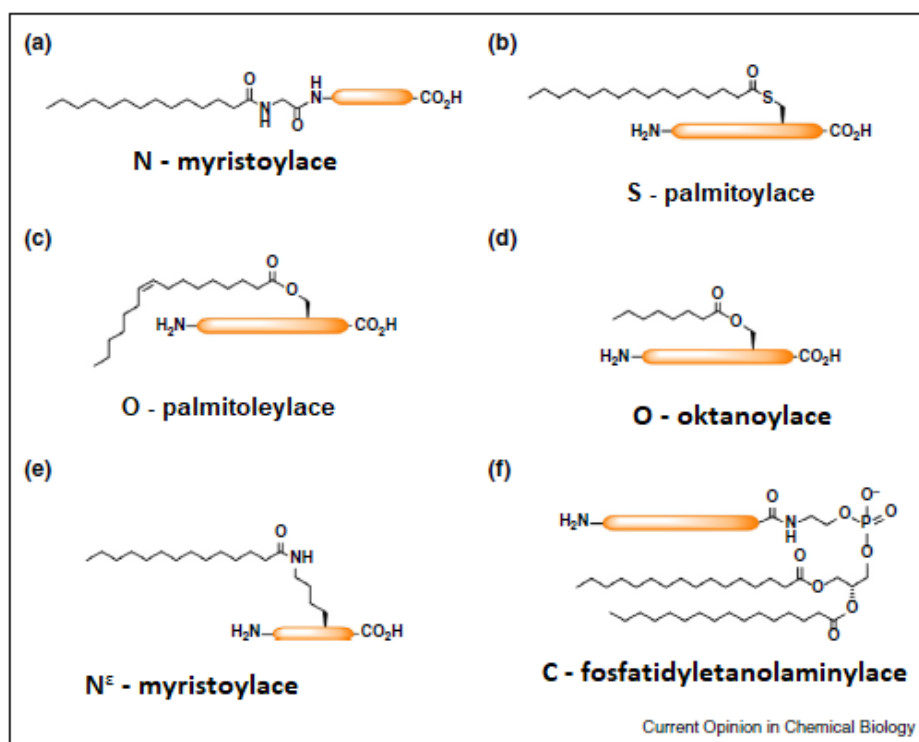
Pro separaci peptidů jsou využívány dva postupy - separace na fázovém rozhraní a extrakce na pevné fázi. Pro experimenty jsou používány syntetické peptidy modifikované kyselinou palmitovou nebo myristovou, a také proteiny, které nesou stejnou modifikaci. V závěru práce je proces separace lipopeptidů aplikován na vzorek tryptického hydrolyzátu proteinu viru myšího tumoru prsní žlázy (MMTV) modifikovaného kyselinou myristovou.

2. Teoretická část

2.1 Lipoproteiny

Lipidace bílkovin je posttranslační modifikace známá již několik desítek let. Jako jedni z prvních na toto téma vydali článek již skoro před sedmdesáti lety Folch a Lees, kteří objevili molekuly proteinů modifikované lipidy v mozkové tkáni ^{1,2}. Toto kovalentní navázání mastné kyseliny na proteinový řetězec umožňuje přímou interakci proteinu s buněčnými membránami ³, regulaci intracelulárního přenosu, subcelulární lokalizaci a další protein – protein interakce ⁴⁻⁷. Lipoproteiny byly nalezeny ve všech formách života, nejsložitější formy těchto molekul se nachází v eukaryotních organismech ^{3,8}. Lipidace také hraje důležitou roli při některých onemocněních ^{9,10}. Mnoho enzymů podílejících se na syntéze lipoproteinů, např. acyltransferázy, se fungují jako nádorové supresory nebo onkogeny, jiné enzymy přispívají k patogenezi nebo mají neurodegenerativní účinky.

Je známo několik způsobů, jak mohou být proteiny modifikovány mastnými kyselinami ^{3-5,9}. Tyto modifikace se liší jak druhem mastné kyseliny, tak i místem, na které se mastná kyselina váže. Z toho důvodu také vznikla specifická označení pro jednotlivé druhy lipidací, např. N - myristoylace, což je označení pro modifikaci kyselinou myristovou na N - konci proteinového řetězce končícího aminokyselinou glycin, dále pak S - palmitoylace, která značí navázání kyseliny palmitové přes thiolovou skupinu na cysteinu. Seriny a threoniny mohou být také modifikovány mastnými kyselinami, takovéto lipidace se označují např. jako O - palmitoylace, O - oktanoylace a jiné ⁵. Některé z těchto modifikací jsou znázorněny na Obr. 1.



Obr. 1 Druhy nejčastěji vyskytujících se lipomodifikací. Převzato z ⁵ a upraveno.

Nejběžnější formy acylace mastnými kyselinami jsou myristoylace a palmitoylace, což jsou modifikace nasycenou mastnou kyselinou se čtrnácti nebo šestnácti uhlíky v řetězci ^{4,5,9}. Enzymologie myristoylace je dnes dobře známá. Aby mohl být protein modifikován kyselinou myristovou, musí začínat jeho sekvence aminokyselinami methioninem a glycínem ^{4,11}. Methionin se kotranslačně odstraní pomocí aminopeptidázy a kyselina myristová je poté navázána z myristoylovaného koenzymu A na glycin prostřednictvím amidové vazby. Reakce je katalyzována N - myristoyltransferázou jejíž izoenzymy jsou exprimovány ve většině tkání a jsou zapojeny do vývoje a progresu onemocnění jako je rakovina, epilepsie, Alzheimerova choroba, Noonanův syndrom a virové a bakteriální infekce ¹¹. Na základě těchto zjištění byl tento enzym v posledních letech velice dobře charakterizován. V porovnání enzymologie palmitoylačních reakcí je více komplexní a složitější. Většina palmitoylovaných proteinů obsahuje kyselinu palmitovou napojenou thioesterovou vazbou k cysteinu, ale může být navázána i na N - terminálním konci řetězce nebo na postraní skupině lysinů. Do dnešní doby bylo objeveno více než 400 lidských proteinů modifikovaných kyselinou palmitovou ¹². Nedávné výzkumy ukázaly, že abnormality

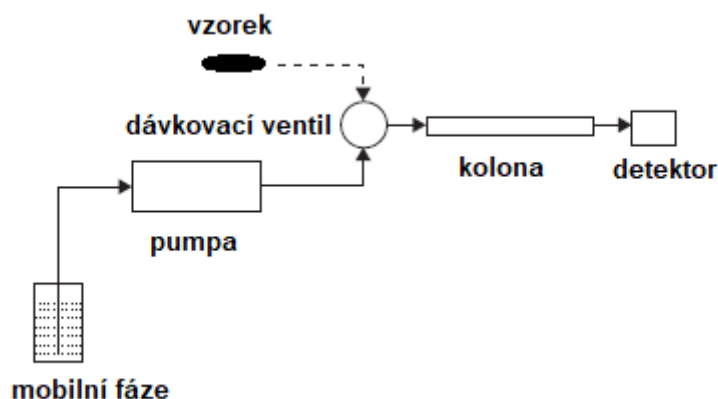
v procesu palmitoylace hrají roli v onemocněních jako schizofrenie nebo Huntingtonova choroba. Počet studií dávajících do souvislosti právě tyto lipoproteiny a onemocnění rakovinou v posledních letech neustále narůstá ^{3-5,11-16}, což klade velký důraz na vývoj nových a spolehlivých metod, jak lipoproteiny analyzovat.

Historicky bylo velice obtížné lipidaci proteinů studovat, z velké části kvůli nedostatku specifických protilátek a omezeným metodám detekce ^{3,5,17}. Tyto poměrně velké hydrofobní řetězce představují problém při izolaci a separaci bílkovin, snižují ionizaci peptidů a proteinů při hmotnostní spektrometrické analýze a jsou špatně značeny radioaktivními izotopy. Lipidace se hojně analyzuje pomocí metabolického značení, začlenění např. alkynu ⁶ nebo azidu do lipoproteinu poskytuje účinný přístup k neradioaktivní detekci a celkové analýze ^{7,17,18}. Alkynové nebo azidové značení umožňuje bioortogonální reakce s fluorofory pro rychlou a citlivou vizualizaci v gelu. Takovéto analýzy se provádějí in situ nebo po izolaci proteinů pomocí chemoselektivních reakcí, které navazují multifunkční značky výhradně na modifikované proteiny. Zavedení fluorescenčních barviv a epitopů umožňuje rychlou a citlivou detekci, zatímco přidáváním afinitních značek, jako např. biotin, umožňuje globální kvantitativní analýzu lipoproteinů pomocí LC-MS ^{19,20}. Tyto způsoby chemického značení jsou široce požívané pro analýzu N - myristoylovaných a S - palmitoylovaných proteinů. Mohou však být použity i pro jiné lipidované bílkoviny. Alternativou pro měření S - acylovaných proteinů je značení díky výměně acyl - biotin, která využívá citlivosti thioesterových vazeb na hydroxylamin ⁵. Tento postup zahrnuje redukci disulfidických vazeb, navázání N - etylmaleimidu na volné cysteiny, rozštěpení thioesterových vazeb hydroxylaminem a vazbu biotinu na nově uvolněné vazby cysteinů. Takto značené proteiny lze použít např. pro Western blott.

2.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je jednou z několika chromatografických metod, které separují a analyzují směsi organických látek ²¹⁻²⁴. Díky komerčně dostupným přístrojům se kapalinová chromatografie stala standardním vybavením všech laboratoří zabývajících se analýzou směsí látek. Postupným vývojem kapalinové chromatografie se do popředí dostala vysokoúčinná kapalinová chromatografie. HPLC

je vybavena čerpadlem mobilní fáze, směšovacím zařízením pro přípravu směsí mobilní fáze pro potřebu gradientové eluce, dávkovačem vzorku a kolonou. Celá aparatura končí detektorem a vyhodnocovacím zařízením ^{21–24}.



Obr. 2 Schéma kapalinové chromatografie. Převzato z ²² a upraveno.

Kapalinová chromatografie je metoda schopná separovat látky s odlišnými vlastnostmi ²⁵. Proto bylo do dnešní doby vyvinuto několik různých módů LC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normální fází, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC), iontově výměnná kapalinová chromatografie a vylučovací kapalinová chromatografie. Správný výběr metody LC zahrnuje také vhodnou volbu stacionární a mobilní fáze.

2.2.1 Kapalinová chromatografie s reverzní fází

Dnes je jedním z nejpoužívanějších způsobů kapalinové chromatografie vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází ^{23,24,26,27}. Ta na rozdíl od HPLC s normální fází používá stacionární fázi s chemicky modifikovanými hydrofobními povrchy a polární mobilní fázi. Mobilní fáze běžně používané pro RP - HPLC jsou směsi vody a organického rozpouštědla. Mezi nejpoužívanější organické složky se řadí methanol, acetonitril nebo jejich kombinace. Méně používané jsou tetrahydrofuran nebo IPA. Stacionární fáze se vyskytuje nejčastěji v podobě silikagelu, na kterém je kovalentní vazbou připojen hydrofobní ligand, nejčastěji oktadecyl (C18), další používanou variantou jsou ligandy C4, C8, C12 a další. Nejrozšířenější detekcí v RP - HPLC se stala UV a hmotnostní detekce ²². Spojení RP-HPLC s MS detekcí se

v dnešní době stalo standardním způsobem analýzy farmaceutických sloučenin a biologických vzorků jako je plazma nebo moč^{22,24,26,28}. Toto uspořádání je používáno k určování molekulové hmotnosti, pro zjišťování sekvencí aminokyselin v molekule proteinů nebo identifikaci posttranslačních modifikací^{22–24,26}.

2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je nepostradatelným analytickým nástrojem v chemii, biochemii, farmacii a lékařství^{29–34}. Tato separační technika se používá k analýze molekul, pomáhá objasnit struktury neznámých látek, kontroluje kvalitu léčiv a potravin, objasňuje proteomické a metabolické otázky, podílí se na objasnění reakčních kinetik a stanovení termodynamických parametrů. V posledních několika desetkách let prošla hmotnostní spektrometrie velkým vývojem.

Základním principem MS je generování iontů z anorganických nebo organických sloučenin, které se následně rozdělí dle poměru jejich hmotnosti a náboje - m/z ^{21,29,30,32,34,35}. Analyt může být ionizován pomocí elektrického pole nebo interakcí s elektrony, ionty, neutrálními atomy nebo fotony. Separace se následně provádí elektrickým nebo magnetickým polem, v některých případech je možné dosáhnout separace i bez účinků těchto polí. Oproti nukleární magnetické rezonanci, infračervené nebo Ramanově spektroskopii se MS řadí do destruktivních metod, jelikož při analýze spotřebovává analyt. Množství spotřebovaného vzorku je v rozsahu několika málo mikrogramů, často ještě o několik řádů níže. Takto nízká spotřeba vzorku činí metodu vhodnou volbou pro analýzy, kdy ostatní metody selhávají, protože nejsou schopny poskytovat informace na základě analýzy nanogramových množství vzorku.

Každý hmotnostní spektrometr se skládá z několika částí - iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru, zdroje vakua a vyhodnocovacího zařízení^{21,29–34}.

2.3.1 Iontové zdroje

Prvním krokem MS analýzy je produkce iontů v plynné fázi^{29,30,32}. Pro tento proces se používají různé ionizační techniky. Některé z nich jsou vysoce energetické a způsobují rozsáhlou fragmentaci analytu. Jiné jsou naopak měkčí a produkují pouze molekulární ionty. Některé ionizační techniky lze použít pouze pro ionizaci v plynné

fázi, např. elektronová ionizace, chemická ionizace. Existují i ionizační techniky pro analyty v kapalně nebo pevné fázi. Pro ionizaci v roztoku se používají techniky elektrospreje, chemické ionizace za atmosférického tlaku nebo fotoionizace za atmosférického tlaku. Analyty v pevném skupenství se ve většině případů ionizují pomocí laserů.

2.3.1.1 Ionizace elektrosprejem

Elektrosprejová ionizace (ESI) je měkká ionizační technika, která dokáže ionizovat analyt přímo z roztoku^{29,30,32,33}. Tato technika je hojně využívána pro analýzu velkých netěkavých molekul, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. ESI je vysoce účinná a je kompatibilní s HPLC nebo s kapilární elektroforézou. Elektrosprej vzniká za pomoci silného elektrického pole, které působí na tenkou kapiláru, která pomalým tokem přivádí kapalný vzorek do komory. Z konce kapiláry se uvolňuje sprej nabitých kapiček, ze kterých se odpaří rozpouštědlo, a vzniknou ionty $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$, $[M + H]^-$. Tento druh ionizace tvoří charakteristické vícenásobně nabitě ionty z molekul s vysokou hmotností - $[M + nH]^{n+}$, $[M + nH]^{n-}$. V současnosti je ESI nejvíce využívanou ionizační technikou za atmosférického tlaku a společně s ionizací laserovou desorpcí za přítomnosti matrice (MALDI) jsou nejvyužívanějším způsobem ionizace vůbec.

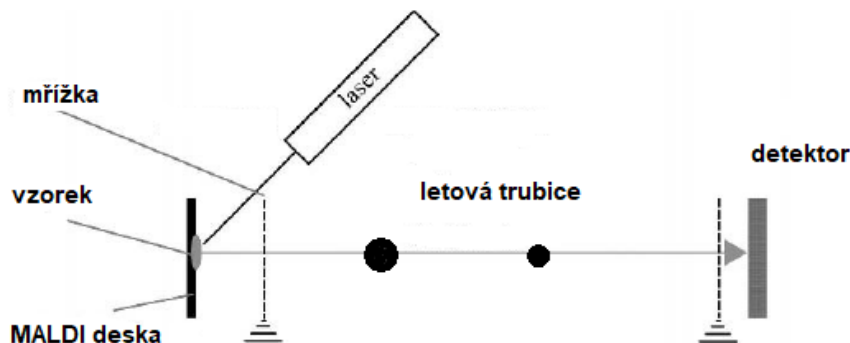
2.3.2 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory mají za úkol separovat ionty na základě podílů jejich hmotnosti a náboje^{21,29-34}. To je umožněno díky působení elektrického nebo magnetického pole nebo jejich kombinace. Mezi nejpoužívanější hmotnostní analyzátory patří kvadrupóly (Q), analyzátory doby letu (TOF), iontové pasti, Orbitrap a iontová cyklotronová rezonance.

2.3.2.1 Analyzátor doby letu

TOF analyzátor dělí ionty na základě jejich rychlosti pohybu v evakuované trubici^{21,29,30,32,34,35}. Ionty jsou ze zdroje vypuzovány ve svazcích například pomocí laseru. V závislosti na jejich poměru hmotnosti a náboje se ionty pohybují rozdílnou rychlostí, tudíž lehčí ionty dorazí do detektoru dříve než ionty s vyšší hmotností. S vyvinutím technik laserové desorpce se TOF analyzátor dostal do popředí v analýze proteinů, oligonukleotidů a polymerů^{29,36}. S TOF analyzátory lze provádět tandemové

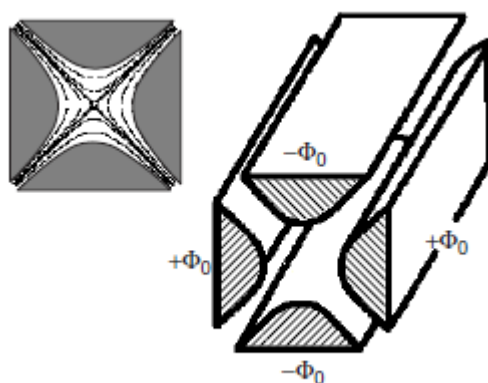
hmotnostní detekce buďto v podobě TOF/TOF nebo v hybridním uspořádání jako je Q-TOF nebo IT-TOF ^{29–31}.



Obr. 3 Schéma analyzátoru doby letu v kombinaci s MALDI. Převzato z ²⁹ a upraveno.

2.3.2.2 Kvadrupól

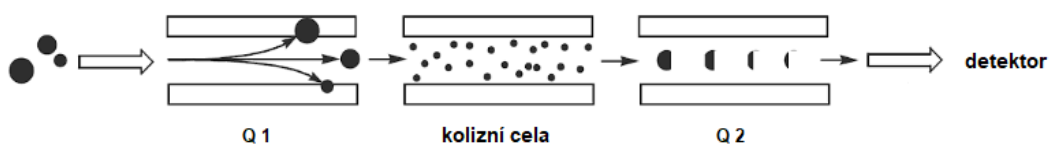
Kvadrupólový analyzátor je zařízení, které dělí ionty na základě jejich oscilačního pohybu v elektrickém poli ^{21,29–34}. Analyzátor je složen ze čtyř rovnoběžných kovových tyčí kruhového nebo hyperbolického průřezu. Iont, který vstoupí do prostoru analyzátoru, bude přitahován nebo odpuzován k tyčím díky působení elektrického pole. Dle nastavení hodnoty napětí pak daný iont buďto projde kvadrupólem do detektoru nebo se zachytí uvnitř kvadrupólu.



Obr. 4 Schéma kvadrupólového analyzátoru a jeho průřez. Převzato z ²⁹ a upraveno.

Kvadrupólové analyzátorů lze také využít pro tandemovou hmotnostní detekci, a to v případě trojitého kvadrupólu ^{29–34}. V tomto uspořádání jsou postaveny tři kvadrupóly za

sebou, kde prostřední z nich slouží jako kolizní cela pro fragmentaci iontů. Toto uspořádání se stalo standardním nástrojem pro LC-MS/MS.



Obr. 5 Schéma trojitého kvadrupólu. Převzato z ³³ a upraveno.

2.4 Aplikace LC-MS na proteomickou analýzu

Kompletní charakterizace všech proteinů je cílem proteomiky už od jejího vzniku ³⁷. Protože celkový proteom organismů představuje velice komplexní soubor látek, jeho analýza je velmi náročná ^{28,38}. Studium proteinů lidského organismu je velmi důležité po vývoj nových a účinných léčiv pro řadu onemocnění, jako je např. rakovina, Alzheimerova choroba, onemocnění srdce. Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií je technikou používanou v proteomické analýze kvůli své schopnosti zvládat obtížnosti spojené s jejich analýzou ³⁹. Proteinová identifikace se obvykle provádí formou analýzy celého proteinu - top down proteomika, nebo analýzou enzymaticky nebo chemicky získaných peptidů - bottom up proteomika ^{37,38,40,41}. Robustnější a všestrannější bottom - up analýza proteinů začíná štěpením komplexních směsí proteinů. Následně jsou pomocí kapalinové chromatografie s reverzní fází separovány vzniklé peptidy. Ionty peptidů vzniklé v iontovém zdroji vstupují do hmotnostního spektrometru, kde dochází k jejich fragmentaci. Naměřená MS spektra jsou prohledávána v databázích a na základě získaných informací je identifikována část nebo celá sekvence proteinu ⁴². Bottom up proteomika umožňuje analyzovat větší počet proteinů v jednom měření. Na druhou stranu získaná směs peptidů představuje vysoký stupeň komplexity vzorku vzhledem k různorodým vlastnostem proteinů a jejich peptidům. Příprava vzorků pro analýzu je proto složitý a časově náročný proces, který je nutné vždy přizpůsobit detekci konkrétní hledané modifikaci, jako fosforylace, lipidace nebo glykosylace ⁴⁰. Fragmentace proteinů v MS poskytuje předvídatelné a reprodukovatelné ionty, které mohou být prohledávány ve specifických databázích proteinů konkrétních organismů a s vysokou pravděpodobností přiřazeny konkrétní

aminokyselinové sekvenci. Tandemová hmotnostní analýza je klíčem k sekvenování proteinů a peptidů a k analýze posttranslačních modifikací včetně modifikací mastnými kyselinami ^{19,20,22,24,26,28,40}.

2.5 Analýza lipopeptidů

Lipopeptidy mají specifické fyzikálně – chemické vlastnosti, které způsobují potíže při kvantitativní a kvalitativní analýze ⁴³. Amfifilní charakter těchto molekul, způsobený přítomností hydrofilního peptidového řetězce a lipidické části molekuly, může vést k tvorbě větších struktur - micel a agregátů. Toto chování způsobuje obtíže při manipulaci se vzorkem. Pozornost je potřeba věnovat použitému laboratornímu nádobí, zejména tomu, které obsahuje plastové komponenty, jejichž povrch přímo interaguje s kapalnými vzorky. Plastové povrchy mohou způsobit výraznou ztrátu analytu kvůli sorpci ještě před samotnou analýzou. Proto první věc, kterou se tato práce bude zabývat, je rozpustnost, stabilita a chování lipopeptidů v roztocích.

Při štěpení komplexního vzorku bohatého na proteiny, kterým může být např. plazma nebo sérum, je nezbytné pro analýzu lipopeptidů výrazně zredukovat matici vzorku ⁴³. Bylo publikováno několik způsobů předúpravy vzorků pro různé lipopeptidy. Nejčastěji se vyskytuje precipitace za pomoci acetonitrilu a ethanolu ⁴⁴ nebo 10% TFA v methanolu ⁴⁵. Další popsané techniky zahrnují extrakci kapalina - kapalina (LLE) in situ ^{46,47}, extrakci na pevné fázi (SPE) ⁴⁸ nebo imunoafinitní techniky. Tyto techniky je však zapotřebí specificky optimalizovat pro lipopeptidy tak, aby poskytovaly co nejlepší a nejspolehlivější výsledky.

LC - MS analýza lipopeptidů a lipoproteinů vykazuje mnoho podobností s analýzou nemodifikovaných peptidů a proteinů ⁴³. Nejčastějším způsobem analýzy je LC na reverzní fázi, jelikož hydrofobní řetězec v molekulách lipopeptidů a lipoproteinů interaguje s nepolární stacionární fází v koloně ⁴⁹. Popsány byly však i aplikace HILIC chromatografie nebo speciálních chirálních sorbentů pro charakterizaci stereochemie lipopeptidů ⁴³. Nejčastěji používaný iontový zdroj pro analýzu lipopeptidů pomocí MS je elektrosprej ²⁹. Tato technika ionizace poskytuje spektra obsahující molekulární

adukty lipopeptidů, díky kterým je možné získat údaje o přítomnosti jednotlivých lipopeptidů ve vzorcích.

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a vybavení

- Syntetický lipopeptid se sekvencí GVSGSK modifikovaný na N - konci kyselinou myristovou - Myr - GVSGSK (ÚOCHB AV ČR, Česká republika)
- Syntetický lipopeptid se sekvencí GVSGSK modifikovaný na N - konci kyselinou palmitovou - Palm - GVSGSK (ÚOCHB AV ČR, Česká republika)
- Protein viru myšího tumoru prsní žlázy (MMTV) modifikovaný na N - konci kyselinou myristovu (ÚOCHB AV ČR, Česká republika)
- Voda Optima LC/MS; kyselina mravenčí; kyselina trifluoroctová (vše Fisher Scientific, USA)
- Methanol LiChrosolv; Ethylacetát Chromasolv; DL - Dithiothreitol; Iodoacetamid BioUltra; 2,2,2 - Trifluoretanol BioUltra (vše Sigma-Aldrich, USA)
- Acetonitril HiPerSolv CHROMANORM (VWR Chemicals, USA)
- 2 - propanol LC-MS (Biosolve, Francie)
- Trypsin, recombinant (Roche CustomBiotech, Německo)
- Chloroform stabilizovaný 1 % ethanolu, predestilovaný (Penta, Česká republika)
- Hydrogenuhlíčitán amonný (Honeywell, USA)
- C - 18 Spin kolony (Pierce, Thermo Scientific, USA)
- Stacionární fáze C - 18, 40 UM, 10 GM (Agilent Technologies, USA)
- Skleněné vialky ROBO Vial, 12 x 32 mm, 9 mm Thread (Chromservis, Česká republika)
- Eppendorf Safe - Lock tubes 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Česká republika)

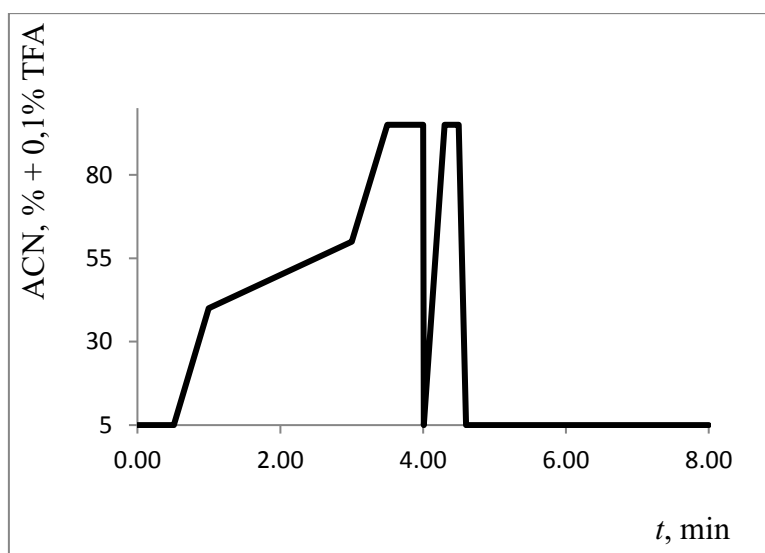
3.2 Instrumentace

- Hmotnostní spektrometr SYNAPT G2 se systémem UPLC I-Class (Waters)
- Kolona ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm
- Software MassLynx V4.1; Synapt G2 HDMS
- Hmotnostní spektrometr TripleTOF™ 5600 s HPLC systémem Dionex ULTIMATE 3000 (AB SCIEX)

- Kolona Acclaim PepMap 100 C18 Column, 100 Å, 3 µm, 75 µm x 15 cm
- Software Analyst TF 1.7.1; PeakView; Chromeleon

3.3 Experimentální podmínky

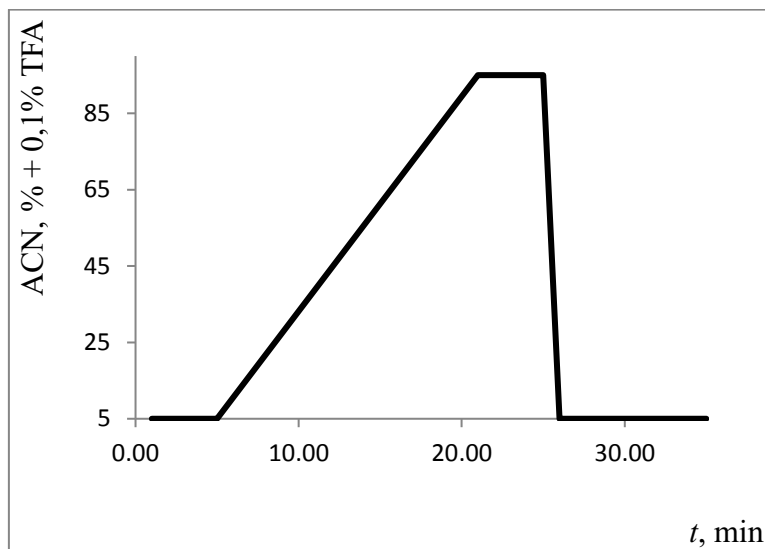
- Waters SYNAPT G2 s UPLC I-Class
 - Teplota kolony 40 °C
 - Průtok mobilní fáze 300 - 400 µl/min
 - Dávkovaný objem vzorku 1 - 5 µl
 - Mobilní fáze H₂O + 0,1% kyselina mravenčí (FA) : acetonitril + 0,1% FA



Obr. 6 Gradient mobilní fáze, Synapt G2.

- Napětí na sprejovací kapiláře 3 kV
- Po každé analýze prováděn proplach kolony 33% roztokem trifluoretanolu (TFE) ve vodě
- AB SCIEX TripleTOF™ 5600 s HPLC systémem Dionex ULTIMATE 3000
 - Teplota kolony 40 °C
 - Průtok mobilní fáze 0,3 µl/min
 - Dávkovaný objem vzorku 1 µl

- Mobilní fáze H₂O + 0,1% kyselina mravenčí (FA) : acetonitril + 0,1% FA



Obr. 7 Gradient mobilní fáze, TripleTOF™ 5600.

- Napětí na sprejovací kapiláře 2,4 kV
- Po každé analýze prováděn proplach kolony isopropylalkoholem

3.4 Příprava zásobních roztoků lipopeptidů

Byly připraveny zásobní roztoky dvou lipopeptidů o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Jako rozpouštědlo byly použity roztoky 20%, 30%, 40% 50% a 60% (obj. %) methanolu ve vodě s přidavkem 0,1 % kyseliny trifluoroctové (TFA).

3.5 Sledování rozpustnosti, stability a chování lipopeptidů v roztocích

Ze zásobních roztoků lipopeptidů viz kapitola 3.4 byly připraveny dvě série roztoků o koncentraci 20 pmol·μl⁻¹. Jako rozpouštědla byly použity roztoky obsahující 20%, 30%, 40% 50% a 60% (obj. %) methanol ve vodě s přidavkem 0,1% TFA. Jedna série roztoků byla po dobu sedmi dní uchovávána ve skleněných vialkách ROBO Vial, 12 x 32 mm, 9 mm Thread (Chromservis), druhá série roztoků byla uchovávána v plastových Eppendorf Safe - Lock tubes (Eppendorf). První, druhý, třetí a sedmý den byly měřeny signály jednotlivých roztoků pomocí SYNAPT G2 Acquity se systémem UPLC. Vyhodnocování ploch píků analytů bylo prováděno pomocí softwaru MassLynx.

Na základě těchto dat byly vyvozeny závěry pro chování lipopeptidů v roztocích o různých koncentracích methanolu, dále pro stabilitu rozpuštěných lipopeptidů v rámci několika dní a vliv použitých materiálů při laboratorní práci.

3.6 Separace na fázovém rozhraní

Do skleněné vialky bylo napipetováno 500 μ l H₂O a 500 μ l chloroformu nebo ethylacetátu. Poté bylo do vialky ze zásobního roztoku napipetováno 0,1 nmol, 1 nmol nebo 20 μ g lipopeptid rozpuštěného ve vodném roztoku 20% methanolu s přidavkem 0,1 % TFA. Následně byla vialka přibližně 2 minuty promíchávána na třepačce a poté vložena do centrifugy za účelem oddělení fází. Pomocí injekční stříkačky byly vodná a organická fáze postupně odebírány do čistých vialek nebo ependorfe tak, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci. Zbylá kapalina, ponechaná v původní vialce, byla označena za tzv. mezifázi. Všechny 3 frakce byly odpařeny do sucha a následně rozpuštěny ve 20% methanolu s 0,1% TFA. Nakonec byla provedena analýza pomocí Waters SYNAPT G2 s UPLC.

3.7 Extrakce na pevné fázi

SPE kolona naplněná fází C18 byla navlhčena 200 μ l acetonitrilu. Následně byla equilibrována 2 x 200 μ l 5% acetonitrilu + 0,1% TFA ve vodě. 1 nmol lipopeptidu rozpuštěného ve vodném roztoku 20% methanolu s 0,1 % TFA bylo naneseno na kolonu a vloženo do centrifugy. Eluát získaný centrifugací byl dvakrát opětovně nanesen na SPE kolonu z důvodu větší jistoty, že byl všechen vzorek zachycen na sorbentu. V dalším kroku byla kolona se vzorkem třikrát promyta 5% acetonitrilem + 0,1% TFA ve vodě. Následně byla na takto připravené koloně prováděna postupná eluce různě koncentrovanými roztoky acetonitrilu nebo isopropylalkoholu ve vodě s 0,1 % TFA. Podrobný popis gradientových kroků viz kapitola Výsledky a diskuze. Jednotlivé eluční frakce byly odebírány do čistých ependorfe a následně odpařeny do sucha. Pro analýzy byly rozpouštěny 20% methanolem s 0,1% TFA.

3.8 Enzymatické štěpení lipoproteinu pomocí trypsinu

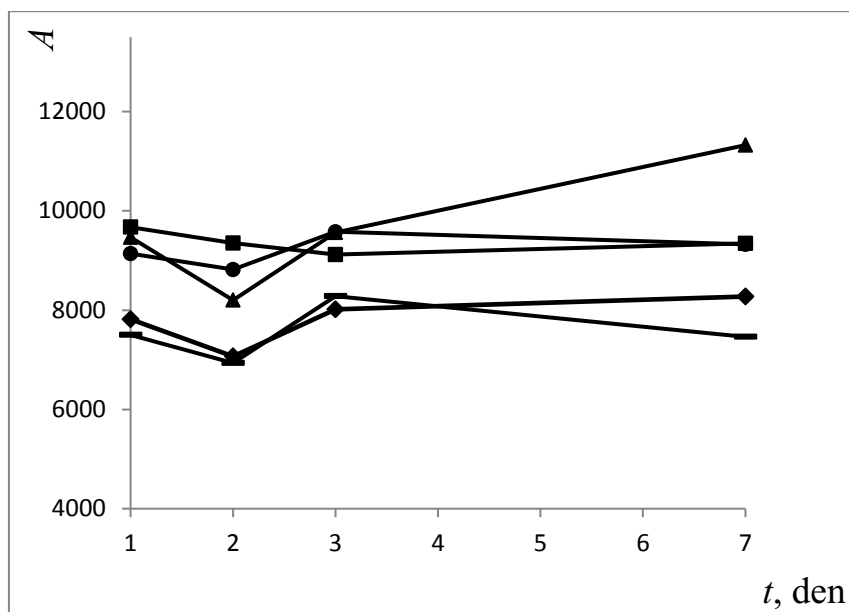
30 μ g proteinu v roztoku pufru bylo naředěno na 100 μ l 50 mM roztokem pufru hydrogenuhličitanu amonného. Následně bylo přidáno 5 μ l 100 mM redukčního činidla dithiothreitol (DTT) ve vodě, roztok byl promíchán a vložen na 30 minut do třepačky

vyhřáté na 65 °C. Pro následnou alkylaci bylo přidáno 15 µl 100 mM jodoacetamidu (IAA) ve vodě a po dobu třiceti minut byla reakční směs proteinu a činidel inkubována za laboratorní teploty bez přístupu světla. Poté bylo přidáno 10 µl DTT a takové množství trypsinu, aby poměr trypsin: protein byl 1:100. Enzymatické štěpení probíhalo 16 hodin při 37 °C v termoshakeru. Po uplynutí této doby bylo štěpení zastaveno přidáním 2 µl 5% kyseliny octové. Vzniklý hydrolyzát byl odpařen do sucha a pro následné analýzy byl rozpouštěn ve 20% methanolu + 0,1% TFA.

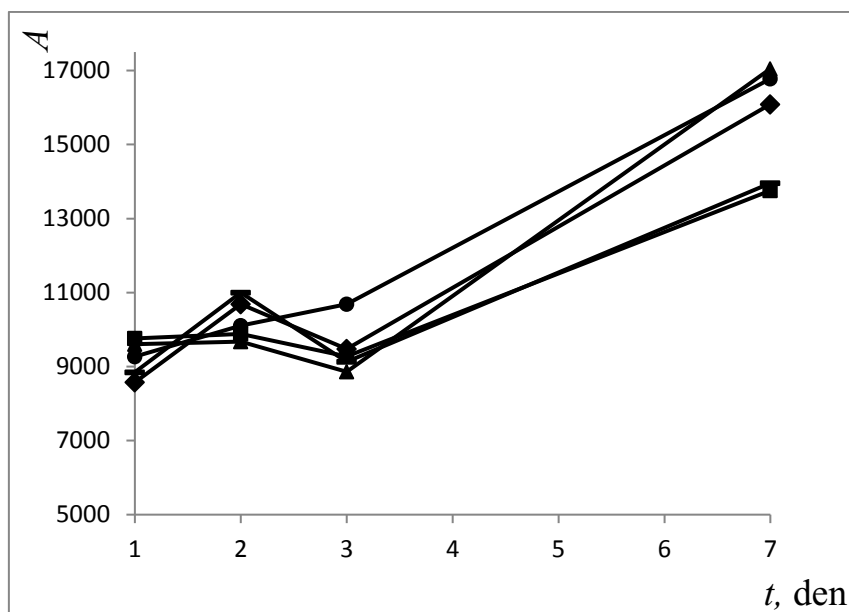
4. Výsledky a diskuze

4.1 Rozpustnost, stabilita a chování lipopeptidů v roztoku

První problém, který se objevil na samém začátku práce, byla rozpustnost lipopeptidů. Při prvním pokusu o rozpuštění pevného lipopeptidu bylo zjištěno, že tyto látky nelze rozpustit ve vodě. Bylo tedy přistoupeno k rozpouštění v roztoku methanolu s přídavkem 0,1% TFA. Pro zjištění nejvhodnější koncentrace methanolu byl navržen experiment, při kterém byly připraveny roztoky lipopeptidů o stejné koncentraci, lišily se pouze v procentuálním zastoupení methanolu. Z naměřených ploch píků v prvním dni měření (Obr. 8 A a B) lze vyvodit, že zvyšující se procentuální zastoupení methanolu v rozpouštěcím roztoku neovlivňuje rozpustnost lipopeptidů. Mírné odchylky naměřených ploch píků pro jednotlivé roztoky jsou dány chybami při pipetování během přípravy samotných roztoků lipopeptidů. Pro následující experimenty byl jako rozpouštědlo používán roztok s nejnižším testovaným obsahem methanolu, tj. 20% methanol s 0,1% TFA z toho důvodu, aby nedocházelo k ovlivňování retence lipopeptidů na chromatografické koloně.



Obr. 8 A Plochy pík (A) lipopeptidů v závislosti na čase pro lipopeptid Palm - GVSGSK uchovávaný ve skle po dobu sedmi dní o koncentraci $20 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. ▲ - 20% methanol, ■ - 60% methanol, ● - 50% methanol, ◆ - 30% methanol, — - 40% methanol; všechny roztoky připravené ve vodě + 0,1% TFA.



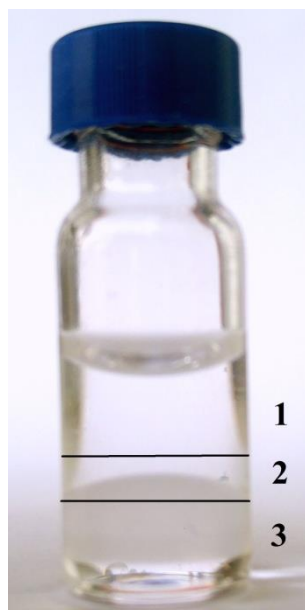
Obr. 8 B Hodnoty ploch píku (A) v závislosti na čase pro lipopeptid Palm - GVSGSK uchovávaný v plastu po dobu sedmi dní o koncentraci $20 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. ▲ - 20% methanol, ■ - 60% methanol, ● - 50% methanol, ◆ - 30% methanol, — - 40% methanol; všechny roztoky připravené ve vodě + 0,1% TFA.

Do dnešního dne bylo publikováno několik prací, které dokazují, že peptidy a lipidy mají schopnost ulpívat v určité míře na plastových i skleněných površích nádob, ve kterých jsou jejich roztoky uchovávány, a proto může docházet k významnému snižování výsledných koncentrací látek ve vzorcích^{50–52}. Na základě těchto informací bylo předpokládáno, že se toto chování bude projevovat i u roztoků lipopeptidů. Byl tedy navržen experiment, kdy roztoky o stejné koncentraci byly uchovávány ve skleněných a plastových vialkách a následně byly tyto vzorky měřeny. Porovnáním ploch píků roztoků lipopeptidů s různým obsahem methanolu v prvním dni měření nedochází k zásadním změnám koncentrací lipopeptidů, které by ovlivňovaly výsledky následujících experimentů (Obr. 8 A, B). První významnou změnu lze pozorovat při měření roztoků až sedmý den. Tuto informaci však nelze považovat za směrodatnou, jelikož byla provedena pouze jedna analýza. Pro vyvození jasných závěrů by bylo nutné opakovat analýzu alespoň třikrát a statisticky vyhodnotit. V mém případě však tato zjištění neovlivňují moje výsledky, jelikož maximální doba, po kterou jsem pracovala s rozpuštěnými lipopeptidy, činila 3 dny, tudíž nedocházelo k žádným zásadním změnám koncentrací v roztocích lipopeptidů v závislosti na množství methanolu v roztoku. Tento experiment dále prokázal, že druh materiálu používaného při experimentech významně neovlivňuje koncentrace lipopeptidů v roztocích. Při následujících experimentech bylo tedy využíváno ve většině případů plastových nádob, jelikož jsou dostupnější, práce s nimi snazší a lze s nimi provádět experimenty, které skleněné materiály neumožňují, jako například SPE s Pierce C - 18 Spin kolonami, které jsou k dispozici pouze v plastovém provedení.

4.2 Separace na fázovém rozhraní

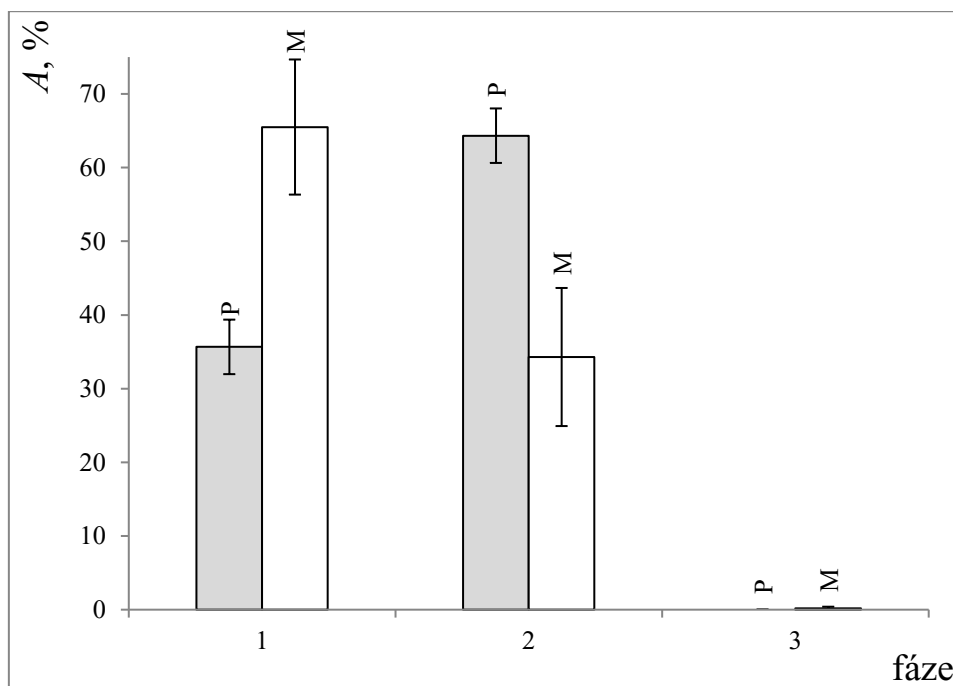
Technika extrakce kapaliny kapalinou je jedním ze způsobů, jak separovat látky na základě jejich hydrofilnosti - lipofilnosti. Díky těmto vlastnostem lze peptidy dělit od lipidů, jelikož peptidy jakožto hydrofilní molekuly zůstávají rozpuštěny převážně ve vodné fázi, naopak molekuly lipidů přecházejí do fáze organické. Na základě těchto informací a znalostí struktury lipopeptidů lze předpokládat, že se tyto amfifilní molekuly koncentrují na rozhraní vodné a organické fáze tak, že lipofilní část molekuly představovaná mastným řetězcem vyčnívá do oblasti organického rozpouštědla, současně hydrofilní peptidická část molekuly zůstává ve vodné fázi. Jelikož samotné rozhraní dvou kapalin lze jen těžko odebírat pro následnou analýzu, byl zaveden pojem

„mezifáze“. Mezifáze je v této práci definována jako objem kapaliny získaný z extrakce tak, aby nad i pod fázovým rozhraním byla přítomna přibližně milimetr vysoká vrstva vodné a organické fáze viz Obr. 9.

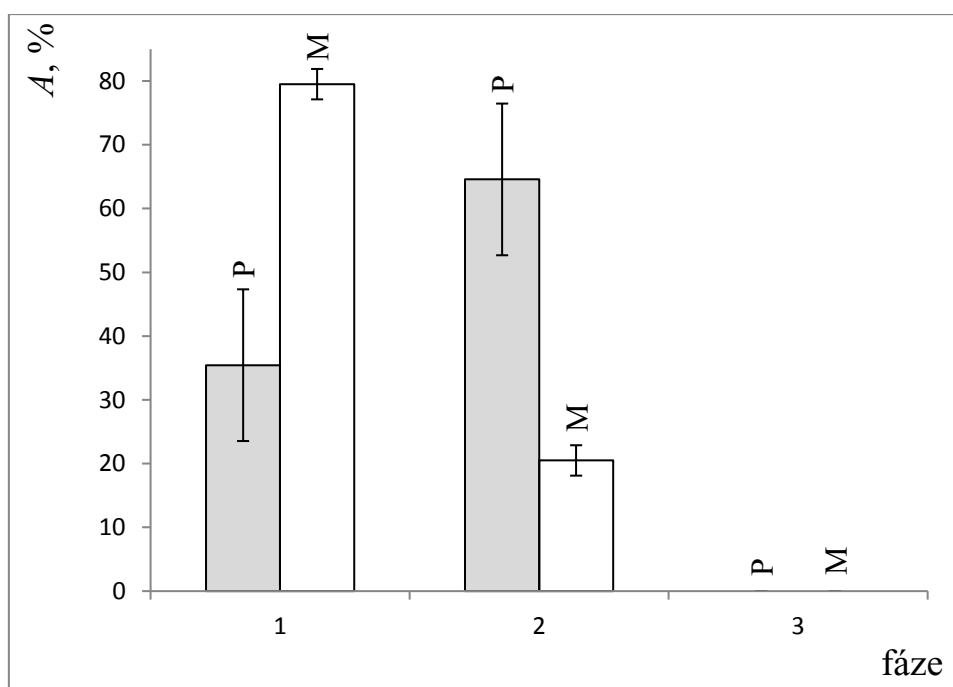


Obr. 9 Vymezení jednotlivých fází v extrakční vialce. 1 – vodná fáze, 2 – mezifáze, 3 – organická fáze.

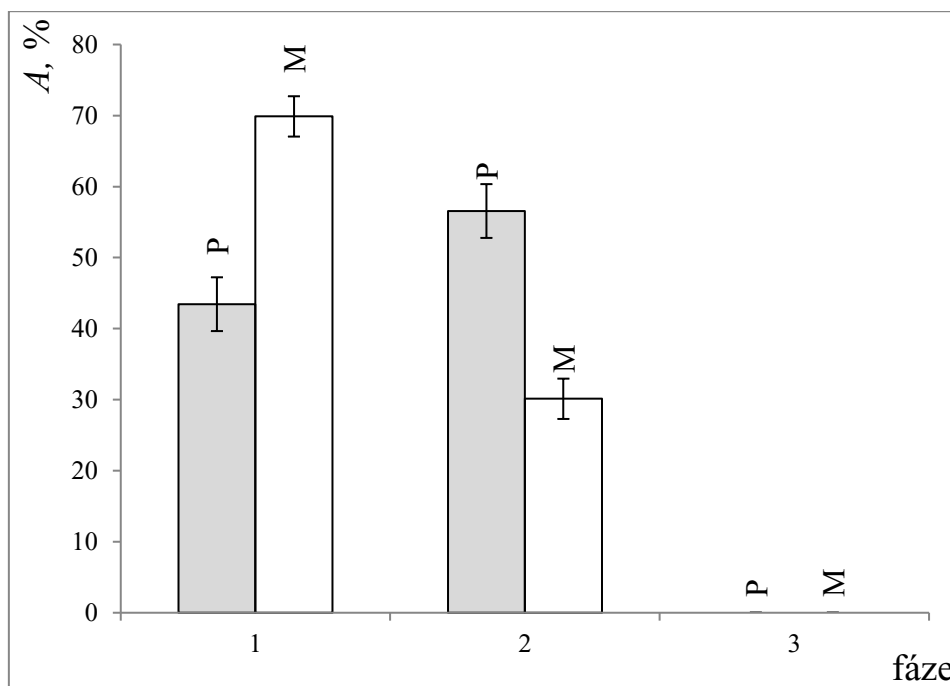
Prvotní extrakce byly prováděny s chloroformem a vodou. Naměřená data dokazovala přítomnost lipopeptidů v mezifázi, avšak značná část analytu byla obsažena také ve vodné fázi, což nebylo žádoucí (Obr. 10 A). Následně byla extrakce prováděna s přidavkem 10% nebo 30% (obj. %) methanolu s cílem ovlivnit rovnováhu rozpustnosti lipopeptidů ve prospěch organické fáze. (Obr. 10 B, C).



Obr. 10 A Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých fázích extrakce bez přidavku methanolu - CHCl_3 : H_2O 50: 50. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. 1 - vodná fáze, 2 - mezifáze, 3 - organická fáze.



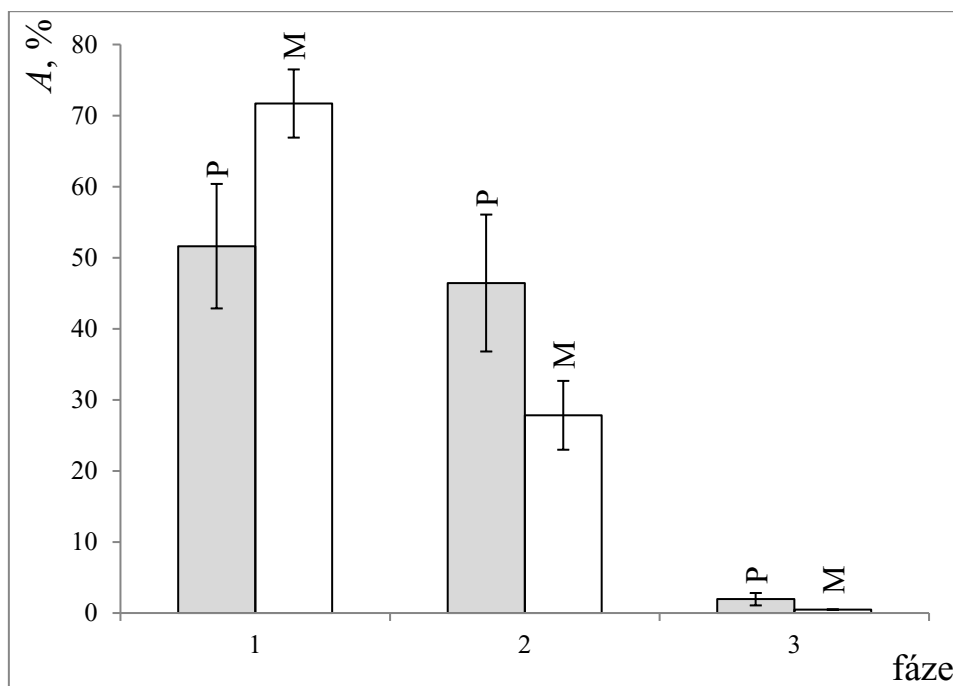
Obr. 10 B Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých fázích extrakce s přidavkem 10% methanolu. CHCl_3 :MeOH: H_2O 40:10: 50. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. 1 - vodná fáze, 2 - mezifáze, 3 - organická fáze.



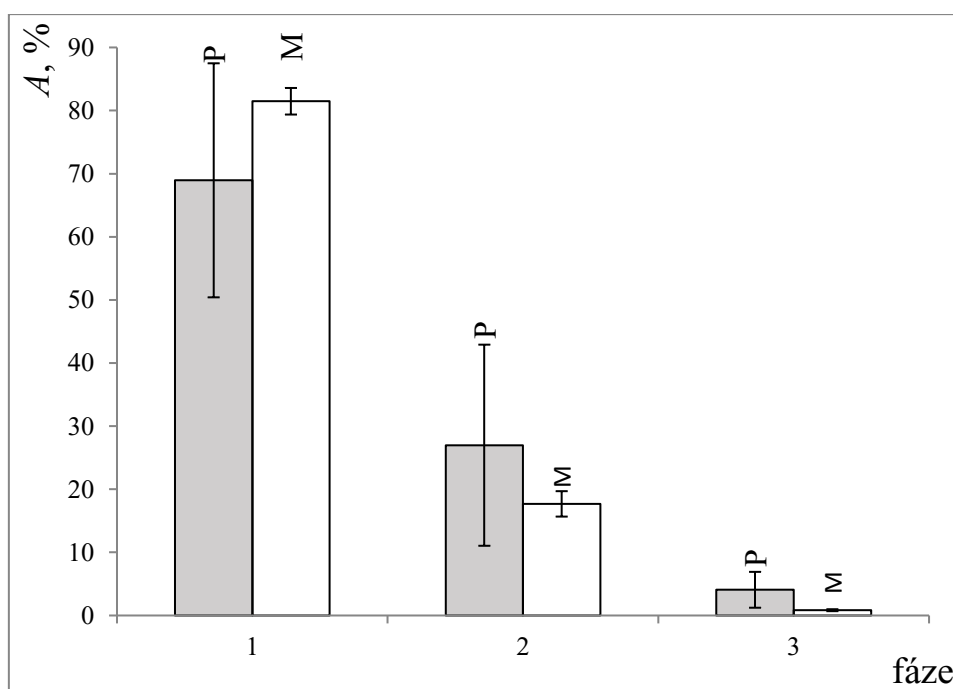
Obr. 10 C Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých fázích extrakce s přidavkem 30% methanolu v organické fázi. CHCl_3 :MeOH: H_2O 20: 30: 50. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. 1 - vodná fáze, 2 - mezifáze, 3 - organická fáze.

Z dat je patrné, že bez ohledu na procentuální zastoupení, přidavek methanolu do organického rozpouštědla neovlivnil rozpustnost lipopeptidů ve prospěch organické fáze. Proto bylo od tohoto postupu dále upuštěno.

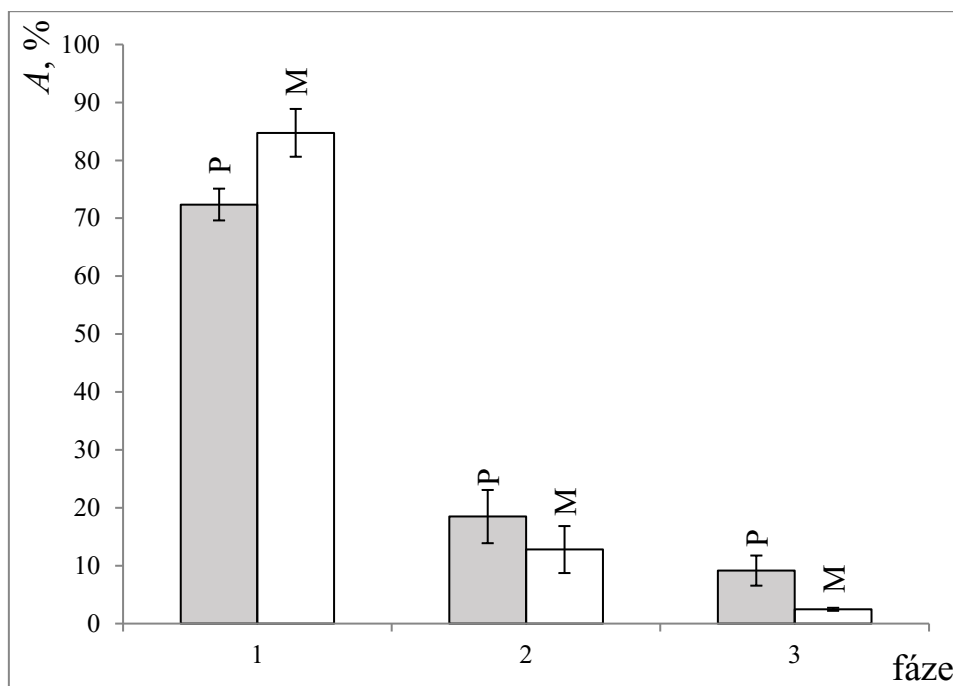
Následně byla prováděna extrakce vodou a ethylacetátem namísto chloroformu, za účelem zjištění, zda jiné organické rozpouštědlo lépe zakoncentruje molekuly lipopeptidů na mezifázi nebo usnadní jejich přechod do organické fáze (Obr. 11 A). Extrakce byla prováděna i s přidavkem 10% nebo 25% (obj. %) methanolu v organické fázi (Obr. 11 B, C).



Obr. 11 A Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých fázích extrakce bez přídavku methanolu. $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$: H_2O 50: 50. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. 1 - vodná fáze, 2 - mezifáze, 3 - organická fáze.



Obr. 11 B Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých fázích extrakce s přídavkem 10% methanolu. $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$: CH_3OH : H_2O 40:10: 50. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. 1 - vodná fáze, 2 - mezifáze, 3 - organická fáze.

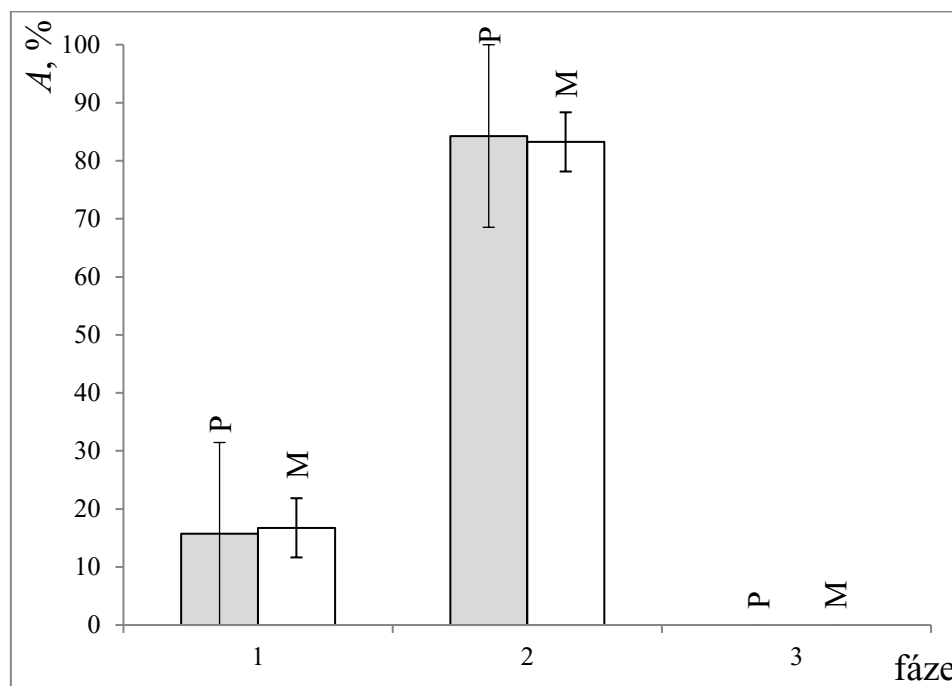


Obr. 11 C Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých fázích extrakce s přidavkem 25% methanolu. $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$: CH_3OH : H_2O 25: 25: 50. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. 1 - vodná fáze, 2 - mezifáze, 3 - organická fáze.

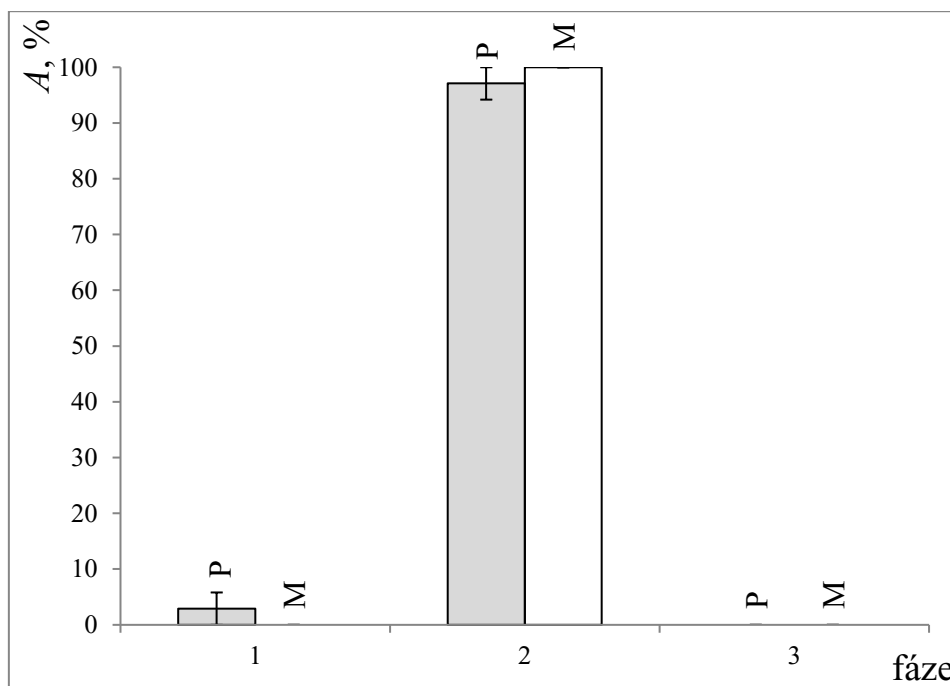
Díky extrakci ethylacetátem bylo dosaženo nepatrného posunu rovnováhy rozpustnosti lipopeptidů ve prospěch organické fáze. Tato naměřená množství jsou však výrazně nižší v porovnání s hodnotami získanými z fáze vodné. V závěru těchto pokusů lze konstatovat, že změna organického rozpouštědla nebo přidavek methanolu, bez ohledu na jeho množství, významným způsobem nezefektivňuje proces kapalinové extrakce a nenapomáhá zakoncentrování lipopeptidů na fázovém rozhraní. Další experimenty byly proto prováděny opět s využitím chloroformu jako organické fáze z důvodu snazší manipulace při procesu odebrání jednotlivých fází.

Jedním z možných důvodů, proč při procesu extrakce nedocházelo k účinné separaci, mohlo být příliš velké množství lipopeptidu. Při všech počátečních experimentech bylo dávkováno 20 μg lipoproteinu, což odpovídá přibližně 26 nmol palmitoylovaného peptidu a 27 nmol myristoylovaného peptidu. Při takovémto množství může docházet vzhledem k nepoměru velikostí fázového rozhraní a mezifáze k nasycení fázového rozhraní lipopeptidem, tudíž přebytečný peptid zůstává ve vodné fázi. Pravdivost této teorie byla otestována v experimentu, při kterém bylo množství

dávkovaného lipopeptidu sníženo z původních 26 nmol, resp. 27 nmol na 1 nmol. Následně byla provedena extrakce stejným způsobem jako v počátečních experimentech. Snížení množství lipopeptidu výrazně zlepšilo separaci a zakoncentrování na rozhraní fází (Obr. 12). Tímto experimentem se prokázalo, že při velkém množství lipopeptidu v extrakci dochází k nasycení fázového rozhraní. Množství 1 nmol lipopeptidu bylo stále nadbytečné s ohledem na velikost mezifáze a proto byl proces zopakován s množstvím 100 pmol lipopeptidu (Obr. 13).

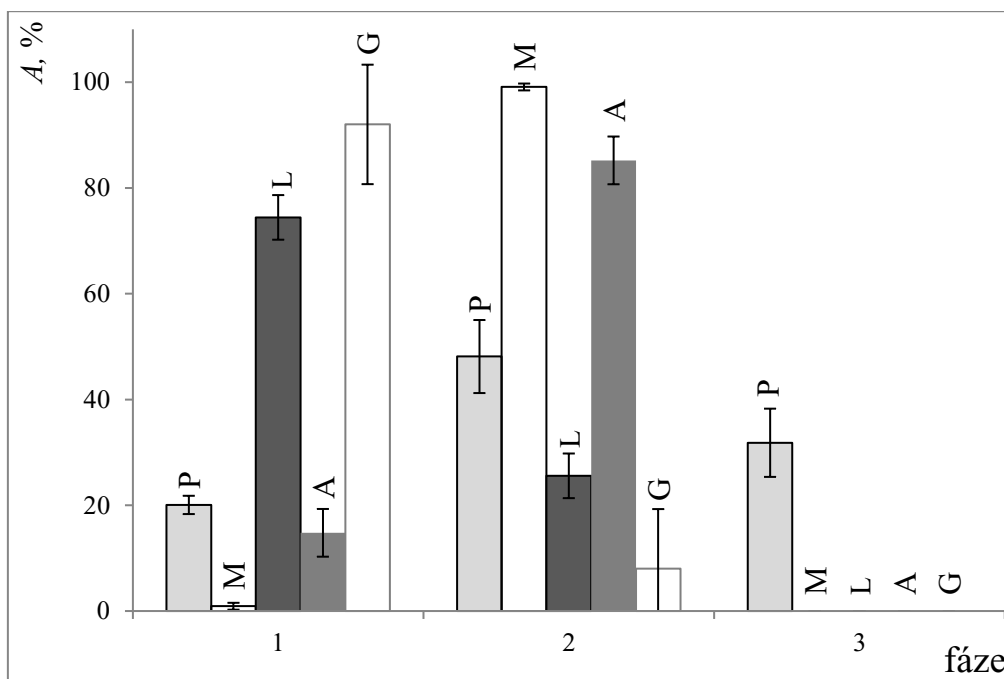


Obr. 12 Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých fázích extrakce při dávkování 1 nmol lipopeptidu. CHCl_3 : H_2O 50: 50. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. 1 - vodná fáze, 2 - mezifáze, 3 - organická fáze.



Obr. 13 Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých fázích extrakce při dávkování 100 pmol lipopeptidu. CHCl_3 : H_2O 50: 50. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. 1 - vodná fáze, 2 - mezifáze, 3 - organická fáze.

Při vnášení 100 pmol lipopeptidu do extrakce bylo dosaženo zakoncentrování lipopeptidů převážně na fázovém rozhraní. To potvrzuje teorii, že lipopeptidy se díky své struktuře nacházejí částí molekuly v organické fázi a peptidový řetězec zůstává ve vodném prostředí. Po tomto zjištění byl postup extrakce aplikován na vzorek obsahující směs studovaných lipopeptidů a peptidů, které tuto modifikaci nenesou, za účelem zmapování chování lipopeptidů při extrakci ve směsi s jinými peptidy. Směs obsahovala vždy 100 pmol myristoylovaného a palmitoylovaného peptidu, 100 pmol peptidu se shodnou sekvencí (GVSGSK) bez modifikace, 100 pmol peptidu se sekvencí YGGFL a 100 pmol peptidu o sekvenci ALILTLVS (Obr. 14).

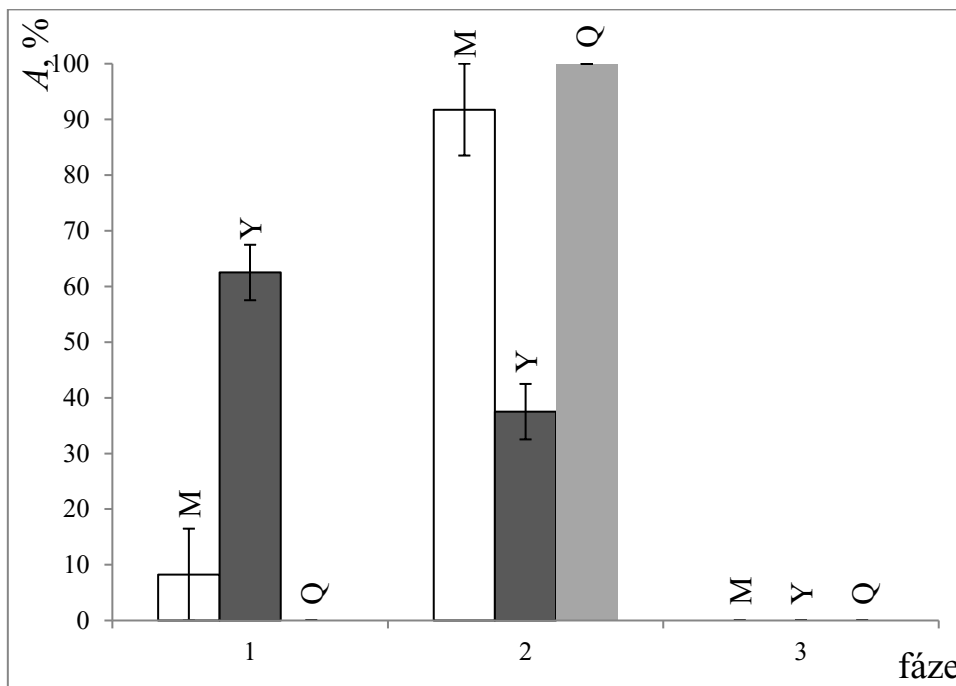


Obr. 14 Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých fázích extrakce při dávkování 100 pmol, CHCl₃: H₂O 50: 50. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK, L – peptid se sekvencí YGGFL, A – peptid se sekvencí ALILTLVS, G - nemodifikovaný peptid GVSGSK. 1 - vodná fáze, 2 - mezifáze, 3 - organická fáze.

Jak je vidět na Obr. 14, provedením extrakce kapalina - kapalina je možné odseparovat značnou část nemodifikovaných peptidů ze směsi. To platí zejména pro silně hydrofilní molekuly, pokud se ve směsi nachází peptid s hydrofobním charakterem, má tendence koncentrovat se na mezifázi podobným způsobem jako lipopeptidy. Toto chování lze pozorovat např. u peptidu se sekvencí ALILTLVS obsaženém v analyzované směsi. I přes tato úskalí provedení extrakce a následná analýza získané mezifáze jsou schopné poskytnout dobré informace o výskytu lipopeptidů v daném vzorku.

V poslední fázi kapalinové extrakce byl postup aplikován na tryptický hydrolyzát proteinu viru myšího tumoru prsní žlázy, který na svém N - konci obsahuje lipopeptid shodný s testovaným N - myristoylovaným lipopeptidem. Ze získaných informací z předchozích měření by postup štěpení, následné kapalinové extrakce a analýzy mezifáze měl být schopen poskytnout jasnou informaci o přítomnosti tohoto lipopeptidu ve vzorku. Společně s myristoylovaným peptidem byly monitorovány dva

náhodně vybrané nemodifikované peptidy vyskytující se v hydrolyzátu, aby bylo možné srovnat chování analytů v takto bohaté směsi peptidů. Ze získaných dat lze vyvodit, že chování lipopeptidů v tryptickém hydrolyzátu je shodné s chováním analytů ve vzorku s vytvořenou směsí peptidů (Obr. 15). Lipopeptid se ve velké míře zakonzcentroval na fázovém rozhraní. Část nemodifikovaných peptidů přešla do vodné fáze, hydrofobní peptid se sekvencí QAYPIWLQLR byl obdobně zakonzcentrován na mezifázi stejně jako peptid ALILTLVS použitý v modelové směsi.



Obr. 15 Plochy píků lipopeptidů a vybraných peptidů v jednotlivých fázích extrakce hydrolyzátu 30 μ g MMTV proteinu, CHCl_3 : H_2O 50: 50. M - Myr - GVSGSK, Y - nemodifikovaný peptid o sekvenci YAAEHGTD SIPK, Q - nemodifikovaný peptid se sekvencí QAYPIWLQLR. 1 - vodná fáze, 2 - mezifáze, 3 - organická fáze.

Z výše získaných informací lze dospět k závěru, že extrakci kapalina - kapalina lze použít jako jeden ze způsobů předúpravy složitějších vzorků určených pro analýzu lipopeptidů. Při tomto postupu dochází odhadem k 10% ztrátám měřeného analytu do vodné fáze a současně k odseparování zhruba 60 % peptidů a jiných hydrofilních molekul, které by mohly jinak komplikovat proces měření. Je však nutné brát v úvahu fakt, že pokud se ve vzorku budou vyskytovat částečně hydrofobní molekuly, s velkou pravděpodobností bude jejich výskyt a chování shodné s lipopeptidy. Řešením tohoto

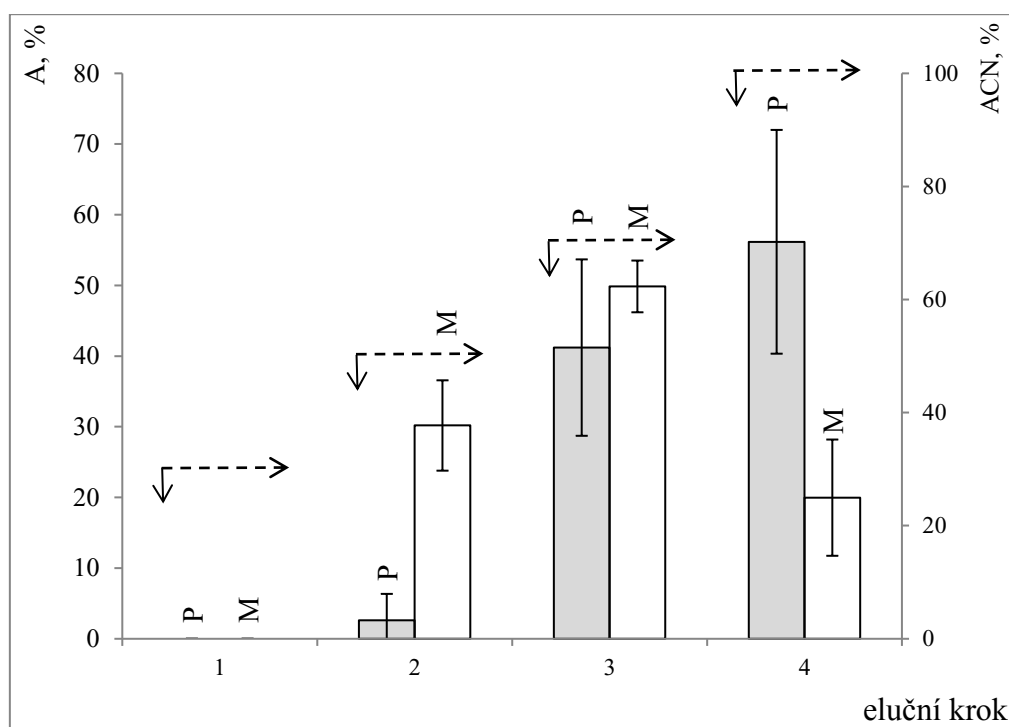
problému je zavedení dalších postupů separace či předúpravy samotného fázového rozhraní získaného z kapalinové extrakce. Tyto postupy jsou však již nad rámec této práce.

4.3 Extrakce na pevné fázi

Extrakcí na pevné fázi je možné separovat směs látek na základě jejich selektivního zadržování na pevném sorbentu. Zadržování analytu je zapříčiněno specifickými interakcemi se stacionární fází. Specificky pro látky obsahující ve své molekule nepolární oblast, v případě lipopeptidů je to mastná kyselina navázaná na peptidovém řetězci, dochází za použití nepolární fáze - zde používaná C18 fáze - k interakcím mezi těmito nepolárními strukturami, a tím ke specifickým separacím od molekul, které žádnou nepolární část ve své struktuře neobsahují, na základě rozdílné síly zadržování analytů na stacionární fázi. Jako eluční roztoky se používají kombinace vodných roztoků se zvyšujícím se podílem organického rozpouštědla s přidavkem kyseliny sloužící jako zdroj protonů při MS detekci. První extrakce byla prováděna s roztoky acetonitrilu ve vodě s přidavkem 0,1 % kyseliny trifluoroctové. Jednotlivé kroky eluce na jedné koloně byly následující (1):

1. 20 µl 30% ACN ve vodě + 0,1% TFA
2. 20 µl 50% ACN ve vodě + 0,1% TFA
3. 20 µl 70% ACN ve vodě + 0,1% TFA
4. 20 µl 100% ACN + 0,1% TFA

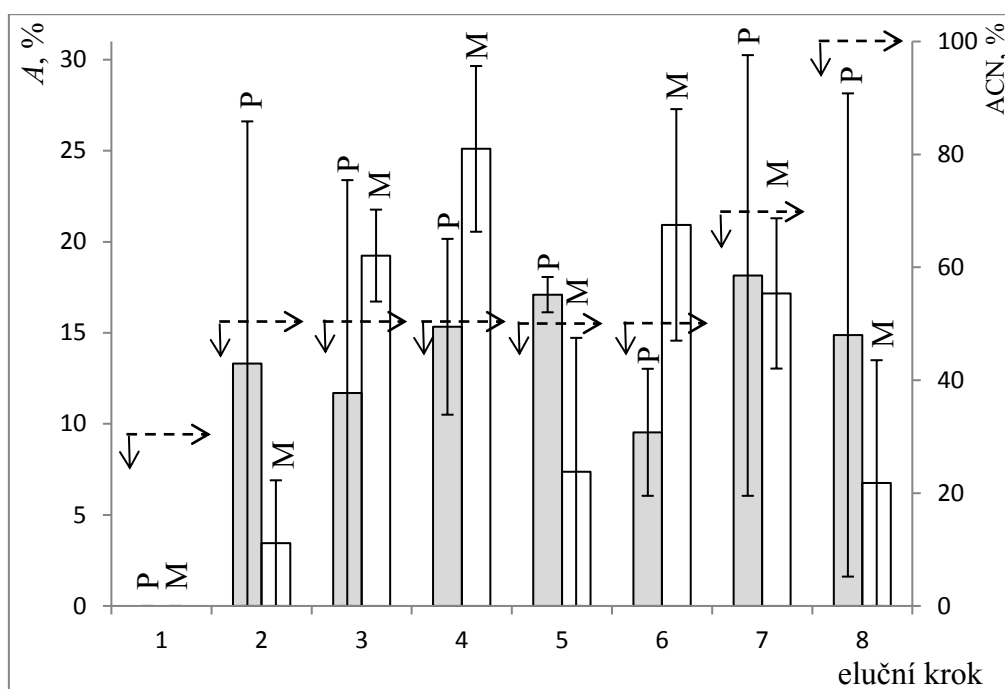
Po analýze těchto čtyř frakcí je patrné, že jak myristoylovaný tak palmitoylovaný peptid z SPE kolonky v malé míře eluuje již při 50% obsahu acetonitrilu v roztoku (Obr. 16). Zatím, co vrchol eluce pro peptid s kyselinou myristovou nastává při 70 % acetonitrilu a dále pak klesá, palmitoylovaný peptid i při 100% obsahu acetonitrilu nadále stoupá. Tento fakt je v souladu se strukturou lipopeptidů. Kyselina palmitová má delší nepolární řetězec, tudíž je na C18 fázi více zadržována než kratší kyselina myristová. To způsobuje že palmitoylovaný peptid eluuje z kolony později.



Obr. 16 Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých frakcích SPE extrakce. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. Přerušovaná křivka značí procento acetonitrilu v elučních roztocích. Po sobě jdoucí eluční kroky aplikované na jednu kolonu: 1 - 20 µl 30% ACN + 0,1% TFA, 2 - 20 µl 50% ACN + 0,1% TFA, 3 - 20 µl 70% ACN + 0,1% TFA, 4 - 20 µl 100% ACN + 0,1% TFA, vše ve vodě.

Problémem při takovémto elučním postupu je skutečnost, že oba lipopeptidy začínají eluovat z kolony už při 50% acetonitrilu v roztoku, avšak i při 100% obsahu acetonitrilu není možné eluovat celé množství lipopeptidu z kolony. To by při případných analýzách mohlo způsobovat výrazné ztráty analytu. Proto byly kroky eluce na jedné koloně upraveny (2):

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. 20 µl 30% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 5. 20 µl 50% ACN ve vodě + 0,1% TFA |
| 2. 20 µl 50% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 6. 20 µl 50% ACN ve vodě + 0,1% TFA |
| 3. 20 µl 50% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 7. 20 µl 70% ACN ve vodě + 0,1% TFA |
| 4. 20 µl 50% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 8. 20 µl 100% ACN + 0,1% TFA |



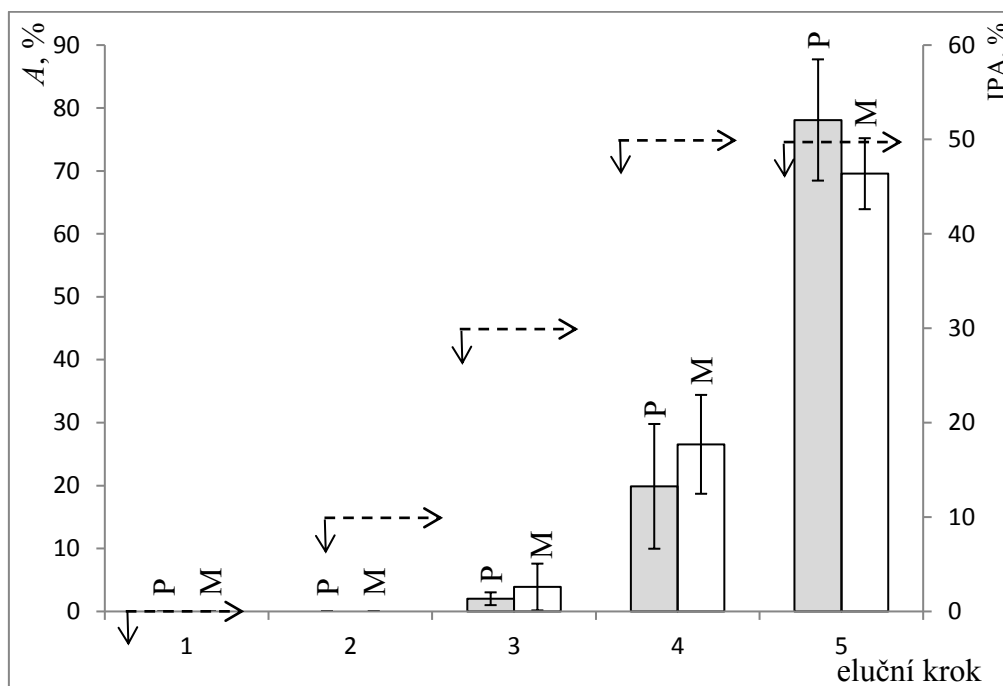
Obr. 17 Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých frakcích SPE extrakce. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. Přerušovaná křivka značí procento acetonitrilu v elučních roztocích. Po sobě jdoucí eluční kroky aplikované na jednu kolonu: 1 - 20 μ l 30% ACN + 0,1% TFA, 2 - 20 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 3 - 20 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 4 - 20 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 5 - 20 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 6 - 20 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 7 - 20 μ l 70% ACN + 0,1% TFA, 8 - 20 μ l 100% ACN + 0,1% TFA, vše ve vodě.

Při navýšení opakování eluce 50% acetonitrem nebylo dosaženo cíle eluce veškerého lipopeptidu z kolony (Obr. 17). Nadále i při 100% obsahu acetonitrilu vykazují vzorky signály o přítomnosti obou lipopeptidů. Neschopnost eluce celého množství lipopeptidu z kolony vedlo k vyzkoušení jiného elučního postupu, za použití kombinace roztoků vody, acetonitrilu a isopropylalkoholu (Obr. 18). Eluční kroky aplikovány na jednu kolonu byly následující (3):

1. 20 μ l 30% ACN ve vodě + 0,1% TFA
2. 20 μ l 30% ACN + 10% IPA ve vodě + 0,1% TFA
3. 20 μ l 30% ACN + 30% IPA ve vodě + 0,1% TFA

4. 20 μ l 30% ACN + 50% IPA ve vodě + 0,1% TFA

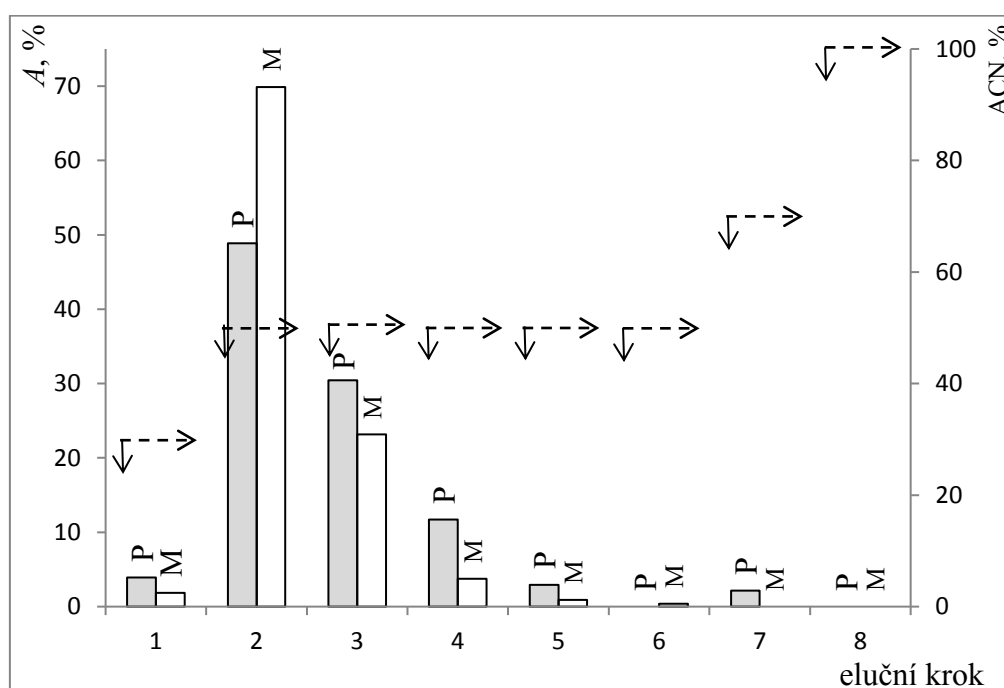
5. 20 μ l 50% ACN + 50% IPA + 0,1% TFA



Obr. 18 Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých frakcích SPE extrakce. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. Přerušovaná křivka značí procento isopropylalkoholu v elučních roztocích. Po sobě jdoucí eluční kroky aplikované na jednu kolonu: 1 - 20 μ l 30% ACN + 0,1% TFA, 2 - 20 μ l 30% ACN + 10% IPA + 0,1% TFA, 3 - 20 μ l 30% ACN + 30% IPA + 0,1% TFA, 4 - 20 μ l 30% ACN + 50% IPA + 0,1% TFA, 5 - 20 μ l 50% ACN + 50% IPA + 0,1% TFA, vše ve vodě.

Změna organického rozpouštědla používaného pro eluci lipopeptidů z kolony nevedla k lepším výsledkům z pohledu snahy eluce veškerého množství lipopeptidu naneseného na kolonu. Proto bylo od tohoto postupu upuštěno a pozornost byla opět zaměřena na úpravu podmínek SPE za použití pouze roztoků acetonitrilu. Možné příčiny neschopnosti eluovat celé množství lipopeptidů z kolony mohly být malý poměr mezi objemem elučního roztoku nanášeného na kolonu a množstvím fáze C18 v koloně. Doposud byly kolony promývány 20 μ l elučního roztoku a plněny 30 mg C18 fáze. Pro množství nanášeného lipopeptidu na kolonu - tedy 1 nmol - by malý poměr mezi objemem elučního roztoku a množstvím stacionární fáze mohl způsobovat přílišné

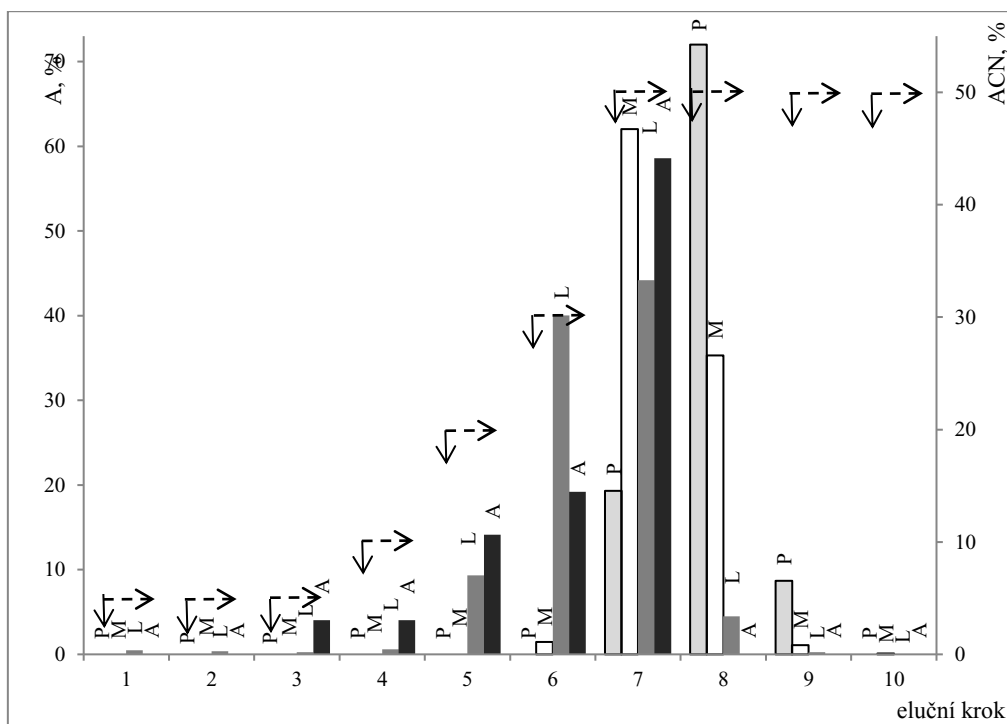
zadržování molekul v koloně a tudíž neschopnost i po opakovaném promývání elučním roztokem vyplavit peptid ze stacionární fáze. Pro další měření byly proto navýšeny eluční objemy na 50 μ l a použity kolony naplněné 8 mg, 4 mg a 2 mg fáze C18 a s takto upraveným postupem byla provedena SPE. Koncentrace elučních roztoku jsou shodné s uvedenými pod označením (2). Výsledky měření s 8 mg fáze C18 zachycuje Obr. 19. Při snížení množství fáze C18 na 8 mg došlo k výraznému zlepšení eluce analytů. Většinu lipopeptidů se podařilo z kolony eluovat již po třetím opakování promývání 50% acetonitrem. Množství 4 mg a 2 mg stacionární fáze se posléze ukázalo jako příliš nízké, jelikož se při analýze elučního roztoku získaného po nanesení vzorku na kolonu ukázalo, že velká část lipopeptidů se na koloně nezadržela, tudíž docházelo k vysokým ztrátám analytů.



Obr. 19 Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých frakcích SPE extrakce při množství stacionární fáze 8 mg. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK. Přerušovaná křivka značí procento acetonitrilu v elučních roztocích. Po sobě jdoucí eluční kroky aplikované na jednu kolonu: 1 - 50 μ l 30% ACN + 0,1% TFA, 2 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 3 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 4 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 5 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 6 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 7 - 50 μ l 70% ACN + 0,1% TFA, 8 - 50 μ l 100% ACN + 0,1% TFA, vše ve vodě.

Po snížení množství fáze C18 na 8 mg a navýšení objemů eluce na 50 µl byl postup aplikován podobně jako v případě kapalinové extrakce na modelovou směs lipopeptidů a nemodifikovaných peptidů. Následnou analýzou jednotlivých frakcí bylo sledováno chování jednotlivých analytů ve směsi, tj. zda dojde k separaci peptidů od lipopeptidů (Obr. 20). Pro přesné zjištění začátku elucí nemodifikovaných peptidů byly navrženy eluční kroky s pozvolným navyšováním procentuálního zastoupení acetonitrilu v elučních roztocích. Postupné eluční kroky aplikované na jednu kolonu (4):

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. 200 µl 5% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 9. 50 µl 50% ACN ve vodě + 0,1% TFA |
| 2. 200 µl 5% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 10. 50 µl 50% ACN ve vodě + 0,1% TFA |
| 3. 200 µl 5% ACN ve vodě + 0,1% TFA | |
| 4. 50 µl 10% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 11. 50 µl 50% ACN ve vodě + 0,1% TFA |
| 5. 50 µl 20% ACN ve vodě + 0,1% TFA | |
| 6. 50 µl 30% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 12. 50 µl 70% ACN ve vodě + 0,1% TFA |
| 7. 50 µl 50% ACN ve vodě + 0,1% TFA | |
| 8. 50 µl 50% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 13. 50 µl 100% ACN + 0,1% TFA |



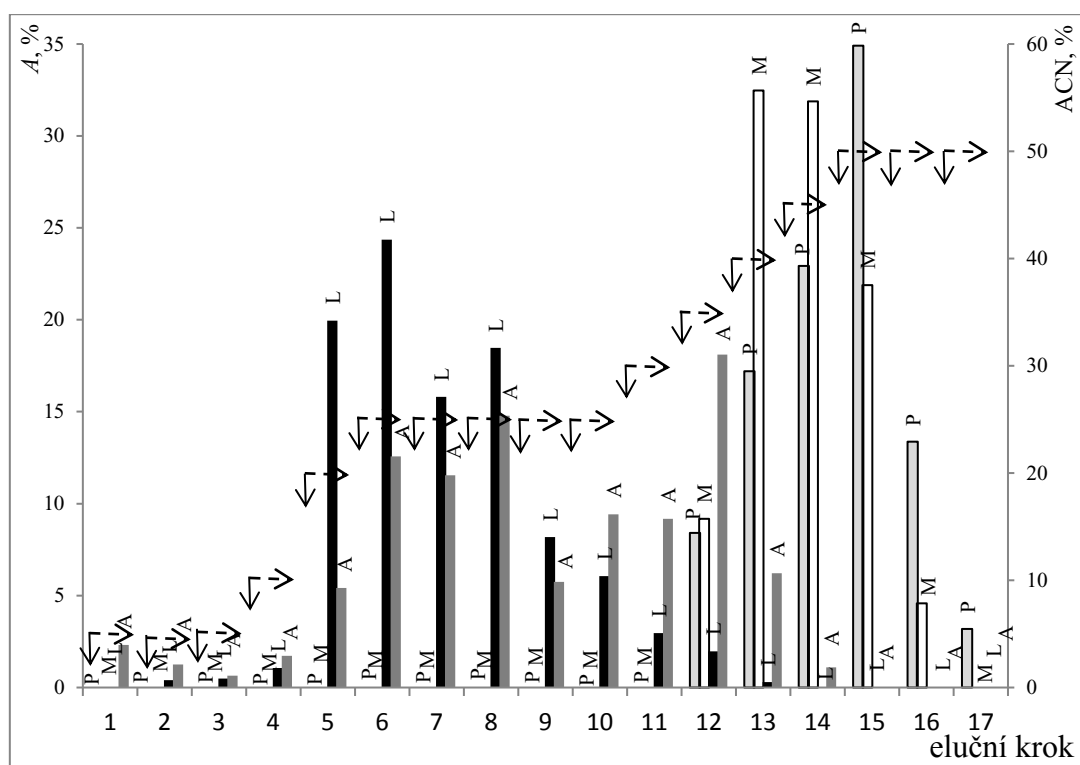
Obr. 20 Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých frakcích SPE extrakce směsi peptidů a lipopeptidů. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK., A - peptid o sekvenci ALILTLVS, L - peptid se sekvencí YGGFL. Přerušovaná křivka značí procento acetonitrilu v elučních roztocích. Po sobě jdoucí eluční kroky aplikované na jednu kolonu: 1 - 200 μ l 5% ACN + 0,1% TFA, 2 - 200 μ l 5% ACN + 0,1% TFA, 3 - 200 μ l 5% ACN + 0,1% TFA, 4 - 50 μ l 10% ACN + 0,1% TFA, 5 - 50 μ l 20% ACN + 0,1% TFA, 6 - 50 μ l 30% ACN + 0,1% TFA, 7 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 8 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 9 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 10 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, vše ve vodě.

Výsledky analýz ukázaly, že použitím tohoto elučního postupu (4) nedošlo k výrazné separaci skupiny peptidů od lipopeptidů, proto byl následně gradient upraven do následující podoby (5):

- | | |
|--|--|
| 1. 200 μ l 5% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 5. 50 μ l 20% ACN ve vodě + 0,1% TFA |
| 2. 200 μ l 5% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 6. 50 μ l 25% ACN ve vodě + 0,1% TFA |
| 3. 200 μ l 5% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 7. 50 μ l 25% ACN ve vodě + 0,1% TFA |
| 4. 50 μ l 10% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 8. 50 μ l 25% ACN ve vodě + 0,1% TFA |

- | | |
|--|--|
| 9. 50 μ l 25% ACN ve vodě + 0,1% TFA | 16. 50 μ l 50% ACN ve vodě + 0,1%
TFA |
| 10. 50 μ l 25% ACN ve vodě + 0,1%
TFA | 17. 50 μ l 50% ACN ve vodě + 0,1%
TFA |
| 11. 50 μ l 30% ACN ve vodě + 0,1%
TFA | 18. 50 μ l 50% ACN ve vodě + 0,1%
TFA |
| 12. 50 μ l 35% ACN ve vodě + 0,1%
TFA | 19. 50 μ l 50% ACN ve vodě + 0,1%
TFA |
| 13. 50 μ l 40% ACN ve vodě + 0,1%
TFA | 20. 50 μ l 70% ACN ve vodě + 0,1%
TFA |
| 14. 50 μ l 45% ACN ve vodě + 0,1%
TFA | 21. 50 μ l 100% ACN + 0,1% TFA |
| 15. 50 μ l 50% ACN ve vodě + 0,1%
TFA | |

V předchozích měřeních (Obr. 20) se ukázalo, že nemodifikované peptidy se z kolony vyplavují již při 20 % acetonitrilu v roztoku. Z tohoto důvodu byl do elučního gradientu zařazen krok opakovaného promývání 25% roztokem acetonitrilu za účelem eluce co největšího množství nemodifikovaných peptidů a současně zamezit eluci lipopeptidů, aby nedocházelo ke zbytečným ztrátám analytu. Tento postup (5) se ukázal jako velice účinný způsob separace viz Obr. 21.

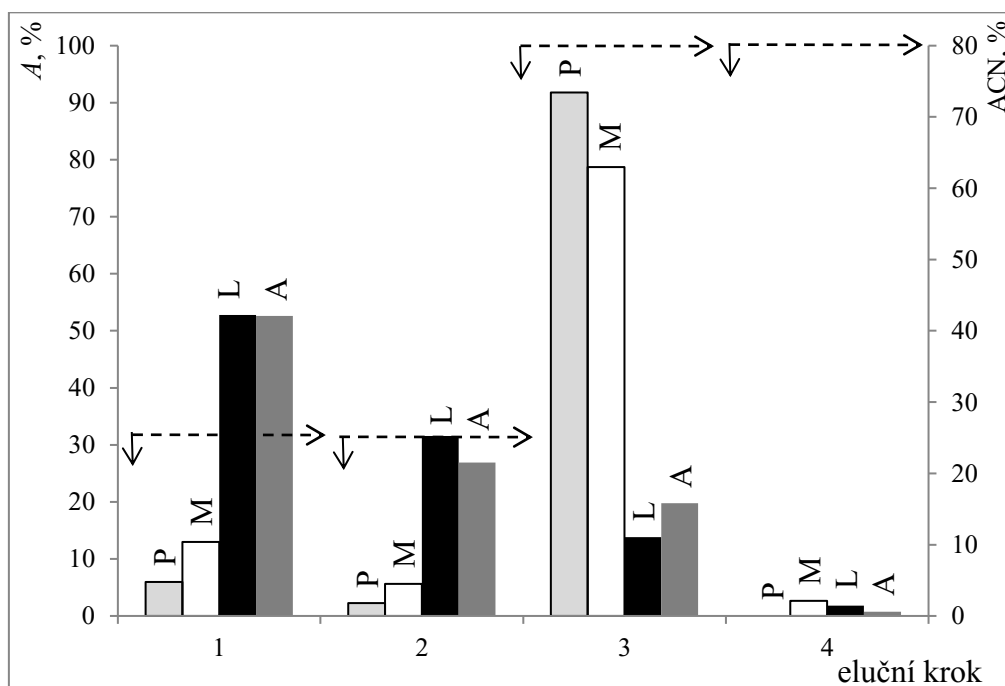


Obr. 21 Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých frakcích SPE extrakce směsi peptidů a lipopeptidů. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK, A - peptid se sekvencí ALILTLVS, L - peptid se sekvencí YGGFL. Přerušovaná křivka značí procento acetonitrilu v elučních roztocích. Po sobě jdoucí eluční kroky aplikované na jednu kolonu: 1 - 200 μ l 5% ACN + 0,1% TFA, 2 - 200 μ l 5% ACN + 0,1% TFA, 3 - 200 μ l 5% ACN + 0,1% TFA, 4 - 50 μ l 10% ACN + 0,1% TFA, 5 - 50 μ l 20% ACN + 0,1% TFA, 6 - 50 μ l 25% ACN + 0,1% TFA, 7 - 50 μ l 25% ACN + 0,1% TFA, 8 - 50 μ l 25% ACN + 0,1% TFA, 9 - 50 μ l 25% ACN + 0,1% TFA, 10 - 50 μ l 25% ACN + 0,1% TFA, 11 - 50 μ l 30% ACN + 0,1% TFA, 12 - 50 μ l 35% ACN + 0,1% TFA, 13 - 50 μ l 40% ACN + 0,1% TFA, 14 - 50 μ l 45% ACN + 0,1% TFA, 15 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 16 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, 17 - 50 μ l 50% ACN + 0,1% TFA, vše ve vodě.

Z obrázku je patrné, že při tomto způsobu eluce (5) analyty eluovaly ve dvou skupinách. V první skupině eluující při 10% obsahu acetonitrilu v roztoku se nacházela převážná většina nemodifikovaných peptidů, přičemž jejich množství postupně klesá při promývání kolony 30% acetonitrem. V té chvíli započne proces eluce, ve kterém dochází k eluci modifikovaných peptidů. Tímto způsobem je možné od sebe s velkou

účinností oddělit jednotlivé skupiny peptidů pouze s malými kontaminacemi nemodifikovaných peptidů - převážně hydrofobních - ve frakci lipopeptidů a bez jejich velkých ztrát. Nevýhodou tohoto postupu je fakt, že zahrnuje 21 elučních kroků, což představuje časovou a materiální náročnost. Dále byl tento postup zjednodušen a upraven tak, aby byly zachovány stejně dobré výsledky separace (Obr. 22). Jako optimální eluční postup aplikovaný na jednu kolonu byl vybrán (6):

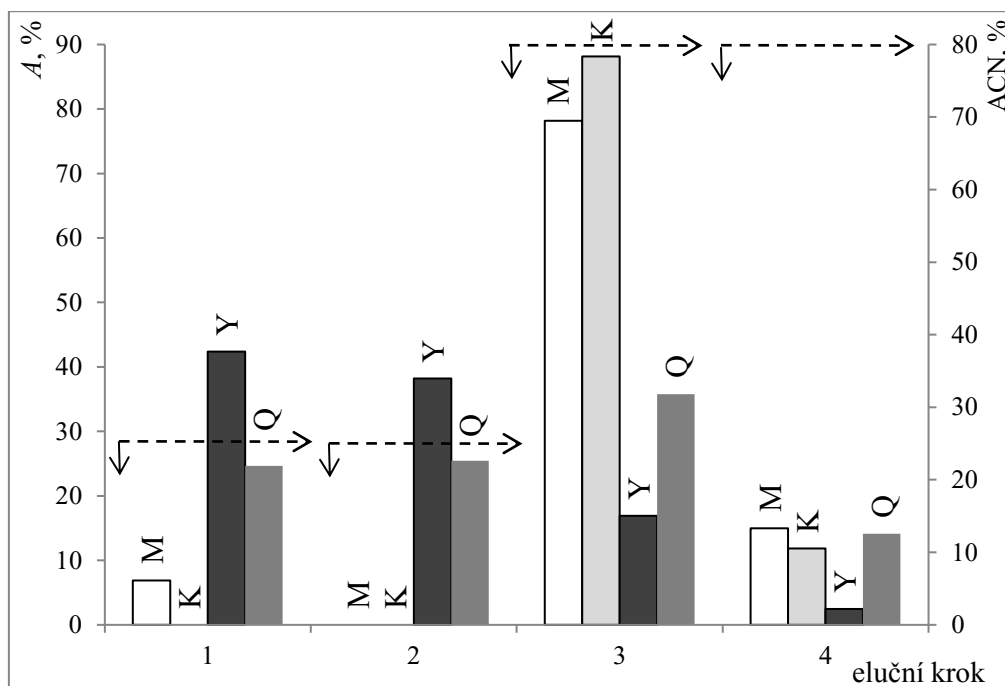
1. 100 μ l 25% ACN ve vodě + 0,1% TFA
2. 100 μ l 25% ACN ve vodě + 0,1% TFA
3. 100 μ l 80% ACN ve vodě + 0,1% TFA
4. 100 μ l 80% ACN ve vodě + 0,1% TFA



Obr. 22 Plochy píků lipopeptidů v jednotlivých frakcích SPE extrakce směsi peptidů a lipopeptidů. P - Palm - GVSGSK, M - Myr - GVSGSK, A - peptid se sekvencí ALILTLVS, L - peptid se sekvencí YGGFL. Přerušovaná křivka značí procento acetonitrilu v elučních roztocích. Po sobě jdoucí eluční kroky aplikované na jednu kolonu: 1 - 100 μ l 25% ACN + 0,1% TFA, 2 - 100 μ l 25% ACN + 0,1% TFA, 3 - 100 μ l 80% ACN + 0,1% TFA, 4 - 100 μ l 80% ACN + 0,1% TFA, vše ve vodě.

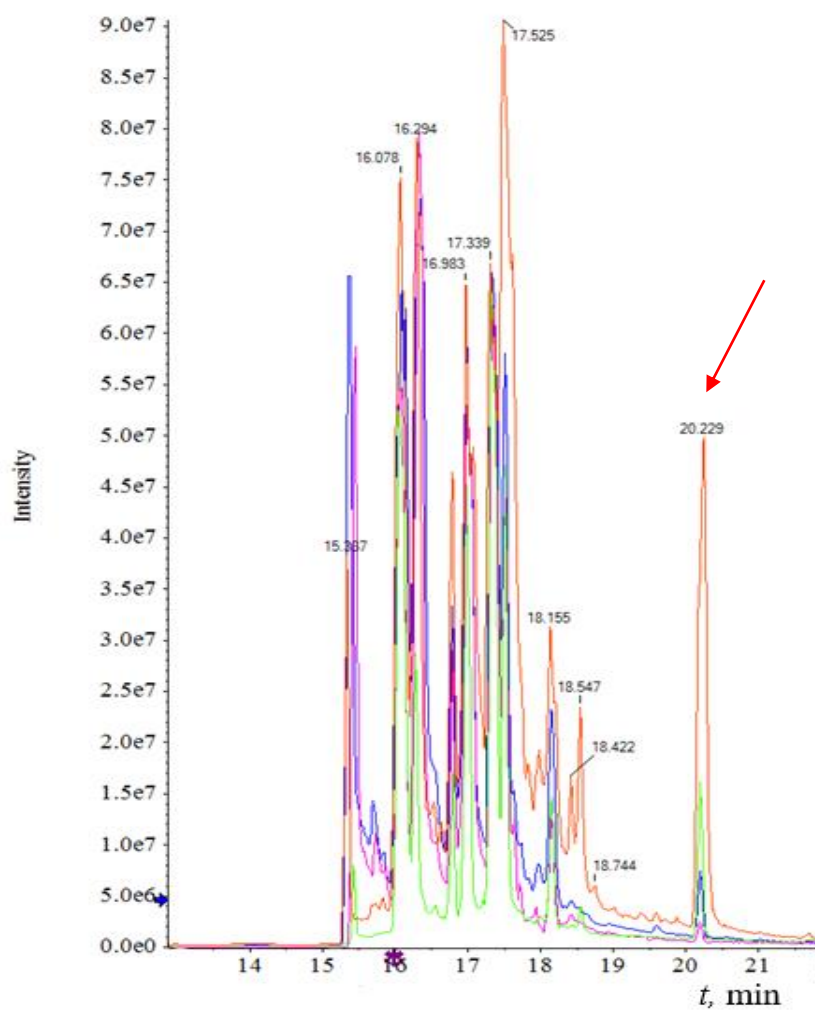
Při takovémto gradientu dochází v prvních dvou krocích k eluci okolo 80 % polárních molekul z kolony. V následujících dvou krocích je pomocí 80% acetonitrilu eluován zbylý analyt z extrakční kolony. Tento zkrácený čtyřkrokový způsob eluce dosahuje stejné separační účinnosti jako postup zahrnující 21 kroků zmíněný výše. V porovnání s ním je však mnohem méně časově náročný.

Takto optimalizovaný čtyřkrokový postup (6) byl aplikován na tryptický hydrolyzát proteinu MMTV za účelem sledování peptidu GVSGSK s kyselinou myristovou na N - konci (Obr. 23). Stejně jako v případě kapalinové extrakce byly do grafu zahrnuty dva nemodifikované peptidy sloužící k porovnání účinnosti separace. Na rozdíl od LLE byl při SPE pomocí databáze identifikován peptid GVSGSKGQK, který je také na N - konci modifikován kyselinou myristovou. Tento lipopeptid je produktem tryptického štěpení lipoproteinu. Při kapalinové extrakci nebyl v žádné z frakcí detegován.

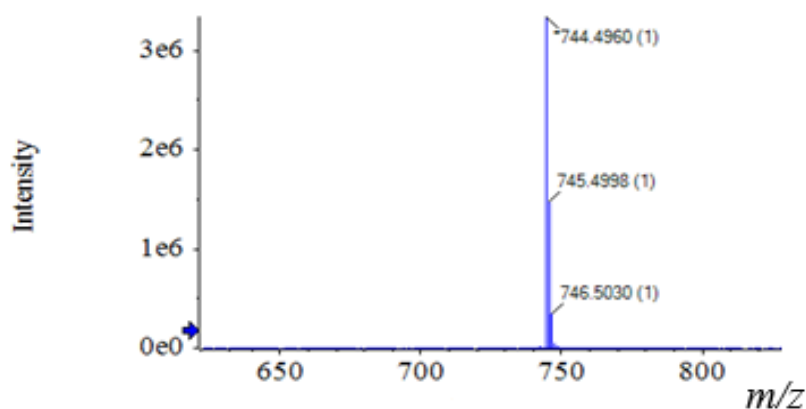


Obr. 23 Plochy píků lipopeptidů a vybraných peptidů v jednotlivých fázích extrakce hydrolyzátu 30 μ g MMTV proteinu. M - Myr - GVSGSK, K – peptid modifikovaný kyselinou myristovou o sekvenci GVSGSKGQK, Y – nemodifikovaný peptid o sekvenci YAAEHGTDSIPK, Q – nemodifikovaný peptid se sekvencí QAYPIWLQLR. Přerušovaná křivka značí procento acetonitrilu v elučních roztocích. Po sobě jdoucí eluční kroky aplikované na jednu kolonu: 1 - 100 μ l 25% ACN + 0,1% TFA, 2 - 100 μ l 25% ACN + 0,1% TFA, 3 - 100 μ l 80% ACN + 0,1% TFA, 4 - 100 μ l 80% ACN + 0,1% TFA, vše ve vodě.

Obr. 24 reprezentuje data získaná z měření SPE frakcí postupu (6) tryptického hydrolyzátu MMTV proteinu. Z chromatogramu (Obr. 24 A) je patrná separace nemodifikovaných peptidů, které eluují z kolony od patnácté do devatenácté minuty, od myristovaného lipopeptidu, jehož retenční čas se pohybuje okolo dvacáté minuty. Zároveň tento chromatogram ukazuje, že nejsilnější signál modifikovaného peptidu byl zachycen v eluční frakci SPE prvního promývání 80% acetonitrilem, jež je znázorněna oranžovou křivkou. Obr. 24 B zobrazuje naměřené hmotnostní spektrum píku s $t_r = 20$, 229 min. Naměřená hmotnost odpovídá hmotnosti molekulárního aduktu $[M + H]^+$ myristovaného peptidu GVSGSK.



Obr. 24 A Ukázka dat získaných z AB SCIEX TripleTOF™ 5600 s HPLC Dionex ULTIMATE 3000. Modrá křivka - SPE frakce první eluce 100 μ l 25% ACN ve vodě + 0,1% TFA, růžová křivka druhá eluce 100 μ l 25% ACN ve vodě + 0,1% TFA, oranžová křivka - první eluce 100 μ l 80% ACN ve vodě + 0,1% TFA, zelená křivka - druhá eluce 100 μ l 80% ACN ve vodě + 0,1% TFA. Pík myristovaného lipopeptidu označen šipkou.



Obr. 24 B Spektrum píku lipopeptidu v $t_r = 20, 229$ min.

Předúprava vzorku pomocí SPE pro následnou analýzu vykazuje podobné výsledky jako výše zmíněná extrakce kapalina - kapalina. Opět dochází k zakoncentrování lipopeptidů převážně do jedné frakce, a to do frakce první eluce 80% acetonitrilem. I při tomto postupu dochází jen k minimálním ztrátám analytu a stejně jako při LLE hydrofobnější peptidy vykazují podobné chování jako lipopeptidy. Jejich separace není tak účinná jako separace hydrofilních peptidů, tudíž dochází jejich prostřednictvím ke kontaminaci vzorku modifikovanými peptidy.

Srovnáním získaných dat jak z SPE tak z kapalinové extrakce nelze zcela určit, která technika předúpravy vzorků je vhodnější či účinnější. Oba způsoby vykazují dobrou účinnost separace směsí analytů. Kapalinová extrakce je limitována velikostí fázového rozhraní. Za použitých podmínek není příliš vhodná pro analýzu vzorků s vysokým obsahem analytu kvůli velikosti fázového rozhraní. Mohlo by docházet ke značným ztrátám analytu způsobeným nasycením rozhraní, a tím pádem k chybnému vyhodnocení obsahu analytu ve vzorku. Pro vzorky s vyšším obsahem analytu je možné zvětšit plochu fázového rozhraní použitím nádob s větším průměrem. Jakou nejnižší možnou koncentraci lipopeptidu je možné takto zanalyzovat je spíše záležitostí parametrů použitého detektoru. Extrakce na pevné fázi je oproti LLE variabilnější. Vhodná je pro vzorky obsahující vyšší koncentrace analytu. Na základě znalosti o přibližném množství analytu ve vzorku je možné upravovat navážku použité stacionární

fáze. Pokud je však analyt ve vzorku obsažen v nízké koncentraci, nadbytek stacionární fáze může působit komplikace při eluci analytu z kolony. Současné snižování navážky stacionární fáze lze provádět jen do určité míry. Pro přesné provedení SPE je potřeba mít stacionární fázi rozprostřenou po celém povrchu dna kolony. Pokud je stacionární fáze tak malé množství, že nevytvoří na dně kolony souvislou vrstvu, nedochází k dostatečné interakci s molekulami vzorku. To způsobí nezachycení analytu na stacionární fázi, a tudíž jeho ztrátu v odpadních kapalinách.

5. Závěr

Cílem mé práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu pro analýzu a separaci lipopeptidů ze směsi vzniklé enzymatickým štěpením lipoproteinu.

První zjištění, ke kterému bylo během práce dospěno, bylo, že lipopeptidy nejsou rozpustné v čisté vodě. Pro jejich úplné rozpuštění je nutné do roztoku přidat určitý podíl organického rozpouštědla - v tomto případě methanolu. Pro práci byl vybrán roztok s obsahem 20 % methanolu s ohledem na následující měřicí proces. Pokud to však pro následné zpracovávání vzorků nečiní problémy, lze obsah methanolu v roztoku navyšovat. I při obsahu 60 % methanolu v roztoku, analyt stále vykazoval stejnou intenzitu signálu jako vzorky s nižším obsahem organického rozpouštědla. Chování myristoylovaného a palmitoylovaného lipopeptidu v roztoku nijak neovlivňuje materiál nádob, ve kterých jsou lipopeptidy uchovávány. Pro práci s lipopeptidy je tedy vhodné skleněné i plastové nádobí.

Prvním ze způsobů separace lipopeptidů ze směsi byla separace na fázovém rozhraní. Jako vhodnější zdroj organické fáze se ukázal čistý chloroform v porovnání s ethylacetátem. Tato separace byla schopna oddělit značnou část nemodifikovaných peptidů od lipopeptidů beztoho, aniž by docházelo k výrazným ztrátám sledovaného analytu. Při tomto způsobu extrakce je však nutné dávat pozor na nasycení fázového rozhraní analytem.

V druhé polovině práce byla věnována pozornost extrakci na pevné fázi. Tento způsob extrakce je provedením snazší než extrakce kapalina – kapalina, ale je velmi limitován v oblastech nízkých koncentrací vzorků. Pro eluci se jako lepší jeví roztoky acetonitrilu s přídavkem kyseliny v porovnání s roztoky obsahující isopropylalkohol. Jako optimální eluční gradient byl zvolen dvakrát proplach 100 μ l 25% acetonitrilu s 0,1% TFA a následně eluce dvakrát 100 μ l 80% roztokem acetonitrilu s přídavkem 0,1% TFA. Při tomto postupu dochází k nejúčinnější separaci bez větších ztrát lipopeptidů ze vzorku.

6. Seznam použité literatury

1. Folch, J. & Lees, M. Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *J. Biol. Chem.* **191**, 807–817 (1951).
2. Aicart-Ramos, C., Valero, R. A. & Rodriguez-Crespo, I. Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 2981–2994 (2011).
3. Tate, E. W., Kalesh, K. A., Lanyon-Hogg, T., Storck, E. M. & Thinon, E. Global profiling of protein lipidation using chemical proteomic technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **24**, 48–57 (2015).
4. Resh, M. D. Fatty acylation of proteins: The long and the short of it. *Prog. Lipid Res.* **63**, 120–131 (2016).
5. Peng, T., Thinon, E. & Hang, H. C. Proteomic analysis of fatty-acylated proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **30**, 77–86 (2016).
6. Hannoush, R. N. & Arenas-Ramirez, N. Imaging the lipidome: omega-alkynyl fatty acids for detection and cellular visualization of lipid-modified proteins. *ACS Chem. Biol.* **4**, 581–587 (2009).
7. Ren, W., Jhala, U. S. & Du, K. Proteomic analysis of protein palmitoylation in adipocytes. *Adipocyte* **2**, 17–28 (2013).
8. Jiang, H. *et al.* Protein Lipidation: Occurrence, Mechanisms, Biological Functions, and Enabling Technologies. *Chem. Rev.* **118**, 919–988 (2018).
9. Hannoush, R. N. Synthetic protein lipidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **28**, 39–46 (2015).
10. Charron, G., Wilson, J. & Hang, H. C. Chemical tools for understanding protein lipidation in eukaryotes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 382–391 (2009).

11. Thinon, E. *et al.* Global profiling of co- and post-translationally N-myristoylated proteomes in human cells. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
12. Yeste-Velasco, M., Linder, M. E. & Lu, Y.-J. Protein S-palmitoylation and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1856**, 107–120 (2015).
13. Fang, C.-Y., Zhang, X.-Q. & Lu, H.-J. Progress in Research Methods for Protein Palmitoylation. *Chin. J. Anal. Chem.* **42**, 616–622 (2014).
14. Wright, M. H., Heal, W. P., Mann, D. J. & Tate, E. W. Protein myristoylation in health and disease. *J. Chem. Biol.* **3**, 19–35 (2010).
15. Resh, M. D. Targeting protein lipidation in disease. *Trends Mol. Med.* **18**, 206–214 (2012).
16. Triola, G., Waldmann, H. & Hedberg, C. Chemical Biology of Lipidated Proteins. *ACS Chem. Biol.* **7**, 87–99 (2012).
17. Charron, G. *et al.* Robust Fluorescent Detection of Protein Fatty-Acylation with Chemical Reporters. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 4967–4975 (2009).
18. Hang, H. C., Wilson, J. P. & Charron, G. Bioorthogonal Chemical Reporters for Analyzing Protein Lipidation and Lipid Trafficking. *Acc. Chem. Res.* **44**, 699–708 (2011).
19. Caballero, M. C. *et al.* Identification of new palmitoylated proteins in *Toxoplasma gondii*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1864**, 400–408 (2016).
20. Jones, M. L., Collins, M. O., Goulding, D., Choudhary, J. S. & Rayner, J. C. Analysis of Protein Palmitoylation Reveals a Pervasive Role in Plasmodium Development and Pathogenesis. *Cell Host Microbe* **12**, 246–258 (2012).
21. Klouda, P. *Moderní analytické metody*. (Pavel Klouda, 2003).

22. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*. (Wiley, 2010).
23. Ardrey, R. E. *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. (J. Wiley, 2003).
24. Fallon, A., Booth, R. F. G. & Bell, L. D. *Applications of HPLC in biochemistry*. (Elsevier ; Sole distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier Science Pub. Co., 1987).
25. Mansoor, M. A. Liquid Chromatography. in *Encyclopedia of Life Sciences* (ed. John Wiley & Sons, Ltd) a0002679.pub2 (John Wiley & Sons, Ltd, 2005).
doi:10.1038/npg.els.0003917
26. LoBrutto, R. & Kazakevich, Y. Reversed-Phase HPLC. in *HPLC for Pharmaceutical Scientists* (eds. Kazakevich, Y. & LoBrutto, R.) 139–239 (John Wiley & Sons, Inc., 2006). doi:10.1002/9780470087954.ch4
27. Sýkora, D., Tesařová, E., Vosmanská, M. & Zvolánková, M. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chem. Listy* **101**, 190–199 (2007).
28. Qian, W.-J., Jacobs, J. M., Liu, T., Camp, D. G. & Smith, R. D. Advances and Challenges in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-based Proteomics Profiling for Clinical Applications. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1727–1744 (2006).
29. De Hoffmann, E. & Stroobant, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. (Wiley, 2011).
30. Gross, J. H. *Mass spectrometry: a textbook*. (Springer, 2004).
31. Lindon, J. C. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. (Elsevier, 2010).

32. Watson, J. T. & Sparkman, O. D. *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*. (John Wiley & Sons, 2007).
33. Henderson, W. & McIndoe, J. S. *Mass spectrometry of inorganic, coordination, and organometallic compounds*. (J. Wiley, 2005).
34. Friedecký, D. & Lemr, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* **20/BCB 41**, 152–157 (2012).
35. Horning, E. C. *et al.* Development and use of analytical systems based on mass spectrometry. *Clin. Chem.* **23**, 13–21 (1977).
36. Hou, T.-Y., Chiang-Ni, C. & Teng, S.-H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J. Food Drug Anal.* (2019).
doi:10.1016/j.jfda.2019.01.001
37. Han, X., Aslanian, A. & Yates, J. R. Mass spectrometry for proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 483–490 (2008).
38. Feist, P. & Hummon, A. Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 3537–3563 (2015).
39. Ali, I., Aboul-Enein, H. Y., Singh, P., Singh, R. & Sharma, B. Separation of biological proteins by liquid chromatography. *Saudi Pharm. J.* **18**, 59–73 (2010).
40. Wither, M. J., Hansen, K. C. & Reisz, J. A. Mass Spectrometry-Based Bottom-Up Proteomics: Sample Preparation, LC-MS/MS Analysis, and Database Query Strategies: MS-Based Bottom-Up Proteomics. in *Current Protocols in Protein Science* (eds. Coligan, J. E., Dunn, B. M., Speicher, D. W. & Wingfield, P. T.) 16.4.1-16.4.20 (John Wiley & Sons, Inc., 2016). doi:10.1002/cpps.18

41. Gundry, R. L. *et al.* Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-Up Proteomics Workflow. in *Current Protocols in Molecular Biology* (eds. Ausubel, F. M. *et al.*) (John Wiley & Sons, Inc., 2009).
doi:10.1002/0471142727.mb1025s88
42. Tabb, D. L. *et al.* Repeatability and Reproducibility in Proteomic Identifications by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **9**, 761–776 (2010).
43. Zemenová, J., Sýkora, D., Maletínská, L. & Kuneš, J. Lipopeptides as therapeutics: applications and *in vivo* quantitative analysis. *Bioanalysis* **9**, 215–230 (2017).
44. Alajlani, M., Shiekh, A., Hasnain, S. & Brantner, A. Purification of Bioactive Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* Strain BIA. *Chromatographia* **79**, 1527–1532 (2016).
45. Shibata, N. *et al.* Highly sensitive quantification of vancomycin in plasma samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and oral bioavailability in rats. *J. Chromatogr. B* **789**, 211–218 (2003).
46. Janek, T., Łukaszewicz, M., Rezanka, T. & Krasowska, A. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresour. Technol.* **101**, 6118–6123 (2010).
47. Tosco, A. *et al.* Characterization by Tandem Mass Spectrometry of Biologically Active Compounds Produced by *Bacillus* Strains. *J. Appl. Bioanal.* **1**, 19–25 (2015).
48. Craig, W. A., Andes, D. R. & Stamstad, T. In Vivo Pharmacodynamics of New Lipopeptide MX-2401. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 5092–5098 (2010).

49. Boone, C. & Adamec, J. Top-Down Proteomics. in *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry* 175–191 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-444-63688-1.00010-0
50. Lee, K. Y. Loss of lipid to plastic tubing. *J. Lipid Res.* **12**, 635–636 (1971).
51. Goebel-Stengel, M., Stengel, A., Taché, Y. & Reeve, J. R. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal. Biochem.* **414**, 38–46 (2011).
52. Kristensen, K., Henriksen, J. R. & Andresen, T. L. Adsorption of Cationic Peptides to Solid Surfaces of Glass and Plastic. *PLOS ONE* **10**, e0122419 (2015).